

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

Metabolismo de fosfolípidos durante la fagocitosis en leucocitos polimosfonucleares humanos

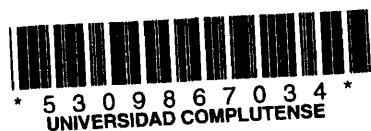
MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Mercedes García Gil

Madrid, 2015

Mercedes García Gil

TP
1984
178



x-53-044226-3

METABOLISMO DE FOSFOLIPIDOS DURANTE LA FAGOCITOSIS
EN LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid
1984



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 178/84

**© Mercedes García Gil
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1984
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: N-20379-1984**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

METABOLISMO DE FOSFOLIPIDOS
DURANTE LA FAGOCITOSIS EN LEUCOC
CITOS POLIMORFONUCLEARES HUMANOS.

Memoria que para optar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS
presenta
MERCEDES GARCIA GIL

Madrid, 1983.

El presente trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigaciones Médicas de la Fundación Jiménez Díaz, bajo la dirección del Dr. José María Mato, adjunto del departamento de Metabolismo, Nutrición y Hormonas.

Mi sincera gratitud, en primer lugar al Dr. J.M. Mato, por su apoyo y estímulo constantes durante la realización de esta Tesis Doctoral.

Agradezco también al Prof. Dr. Angel Martín Mencia, que me ha honrado con aceptar la ponencia de esta Tesis, los conceptos bioquímicos que supo inculcarme durante mi formación universitaria.

Quiero expresar asimismo mi agradecimiento a mis compañeros de laboratorio Susana Alemany, Fernando Alonso, Vicente Alvarez, Asunción de la Cruz, Dolores Marín, Estrella Martín-Crespo, María Pajares, Mariano Sánchez, Juan Teaver y Isabel Varela, y a mis amigos Cristina León, J. Alberto Amic y Ricardo Fraile por su colaboración.

Por último no puedo olvidar las facilidades dispensadas por la Fundación Jiménez Díaz y la beca concedida por el INSALUD que he disfrutado durante los dos últimos años.

INDICE

1.- INTRODUCCION

1.1.- Leucocitos polimorfonucleares	1
1.2.- Desgranulación	5
1.3 1.3.- Explosión oxidativa.....	14
1.4.- Membranas.....	16
1.5.- Transcolinación	19
1.6.- Transmetilación	23
1.7.- Metabolismo del fosfatidilinositol.....	32
1.8.- Metabolismo del ácido araquidónico.....	38
1.9.- Factor activante de plaquetas	42

2.- OBJETIVOS 44

3.- MATERIAL Y METODOS

3.1.- Material.....	46
3.2.- Métodos	
3.2.1.- Aislamiento de leucocitos PMNs.....	47
3.2.2.- Opsonización del zimosa.....	48
3.2.3.- Metilación de fosfolípidos.....	48
3.2.4.- Actividad agregante de plaquetas.....	48
3.2.5.- Actividad β -glucuronidasa.....	49
3.2.6.- Incorporación de colina, etanolamina y serina marcadas en fosfolípidos.....	50
3.2.7.- Medida de la actividad CDP-colina: 1,2-di- ciglicerol fosfocolintransferasa.....	50
3.2.8.- Liberación de ácido araquidónico y de ara- quidónico diglicérido	51
3.2.9.- Fagocitosis.....	52
3.2.10.- Medida de incorporación de colina en CDP- colina.....	52
3.2.11.- Actividad digliceridolipasa en PMNs.....	52

4.- RESULTADOS

4.1.- Efecto de Zc sobre la PMT en PMNs humanos..	54
4.2.- Correlación entre la inhibición de la PMT y los efectos biológicos producidos por el Zc	54
4.3.- Cinética de la PMT.....	59

- II -

4.4.- Metilación en células intactas.....	60
4.5.- Incorporación de serina y etanolamina marca- das en fosfolípidos. Efecto del Zc.....	63
4.6.- Efecto de 3'-deazaadenosina y homocisteína tiolactona en la metilación de fosfolípidos.	63
4.7.- Acción de péptido quimiotácticos sobre PMT..	66
4.8.- Efecto de nucleótidos sobre PMT.....	67
4.9.- Estimulación de la síntesis de PC por trans- colinación en PMNs estimulados con Zc.....	67
4.10- Cinética de la CDP-colina:1,2-diacilglicerol fosfocolina transferasa	69
4.11- Efecto de la 3'-deazaadenosina y homocisteína tiolactona en la incorporación de colina	73
4.12- Efecto del Zc sobre la liberación de ácido araquidónico.....	75
4.13- Efecto del Zc sobre la producción de diacil glicerol.....	77
4.14- Origen del ácido araquidónico liberado	77
4.15- Efecto de la isobutylmetilxantina y de qui- nacrina sobre la liberación de ácido araquid- ónico.....	80
4.16- Incorporación de colina en CDP-colina.....	80
4.17- Actividad diglicérido lipasa	81
4.18- Efecto de inhibidores de la transglutamina- sa, serinesterasas y antivíricos sobre el me- tabolismo de PC.....	82
5.- DISCUSION	
5.1.- Síntesis de PC en PMNs humanos	85
5.2.- Liberación de ácido araquidónico.....	98
5.3.- Efecto de inhibidores de endocitosis sobre el metabolismo de PC.....	106
6.- CONCLUSIONES.....	112
7.- BIBLIOGRAFIA.....	114

ABREVIATURAS

Aa: ácido araquidónico
AMP, ADP, ATP: adenosina 5'-mono, di- y trifosfato
cAMP: ácido adenílico cíclico
ACTH: hormona adrenocorticotropa.
AdoHcy: homocisteína tiolactona
AdoMet: S-adenosil-L-metionina
AGEPC: 1-O-alkil-2-acetil-3-glicerofosfocolina.
CMP, CDP, CTP citidina mono-, di- y trifosfato
cGMP: ácido guanílico cíclico
Con A: concanavalina A
CDP-colina: citidindifosfocolina
CDP-etanolamina: citidindifosfoetanolamina
EGTA ácido etilenglicol diaminotetraacético.
FMLP: formil-metionil-leucil-fenilalanina
HEPES; ácido 4(2-hidroxietil)-piperacín-1-etan-sulfónico
HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico
HHT: ácido hidroxieptadecanoico
HPTE: ácido hidroperoxieicosatetraenoico
GSH: glutathion reducido
GSSG: glutathion
Ig: inmunoglobulina
PAF: factor agregante de plaquetas
PF4 factor 4 de plaquetas
PMA: acetato forbolmirístico
PMN leucocitos polimorfonucleares
PMT: S- adenosil-L-metionina: fosfatidiletanolamina-N-metil-transferasa
PG: prostaglandina
PC: fosfatidilcolina
PME: fosfatidil-N-monometiletanolamina
PDE; fosfatidil-N,N-dimetiletanolamina
PI: fosfatidilinositol
DPI: fosfatidilinositol 4-fosfato
TPI: fosfatidilinositol 4,5bifosfato
LPC: lisofosfatidilcolina
LPI: lisofosfatidilinositol
PA: ácido fosfatídico
RBL; Basófilos de rata leucémica

- IV -

TMB-8: 8-(N,N'-dietilamino)octil- 3,4,5- trimetoxibenzoato
TB: tromboxano

TG, DG, MG: tri- di- monoacilglicerol

GP glicerol fosfato

Zc: zimosán revestido de complemento.

Enzimas:

-fosfocolina transferasa: CDP-colina: 1,2, diglicérido
fosfocolina transferasa

fosfoetanolamina transferasa: CDP-etanolamina: 1,2 di-
glicerido fosfoetanolamina transferasa

citidiltransferasa: CTP: fosfocolina citidiltransferasa

PMT: S-adenosil-L-metionina: fosfatidiletanolamina-N-me
tiltransferasa.

1.- INTRODUCCION

1.1. LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES

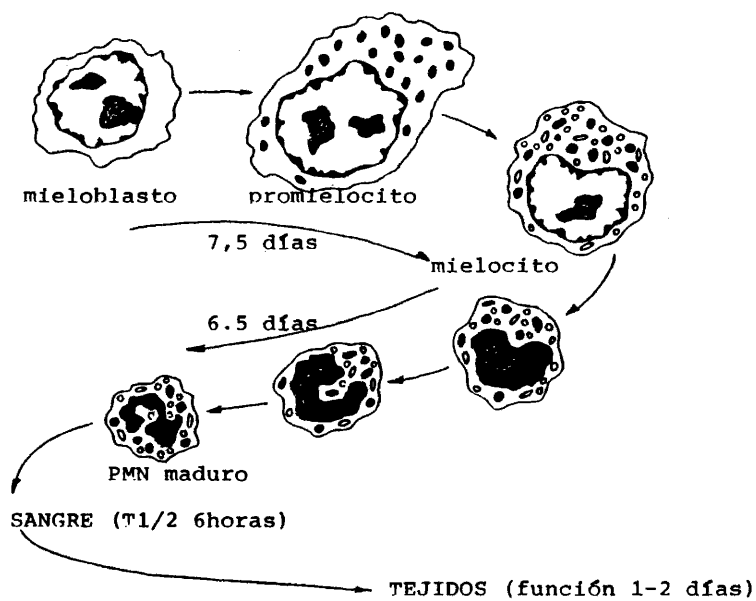
Los leucocitos periféricos se dividen en formas granulares y agranulares. Los monocitos son células mononucleares que contienen escaso número de gránulos. En el hombre, los granulocitos se dividen en eosinófilos, basófilos y neutrófilos, de acuerdo con la afinidad de sus gránulos por los colorantes ácidos o básicos que se utilizan corrientemente.

Los neutrófilos tienen como misión fundamental la lucha contra los agentes patógenos que invaden el organismo.

Durante el siglo pasado, Metchnikoff y sus seguidores pensaron que la fagocitosis era el principal mecanismo de defensa(1). Ehrlich propuso la hipótesis de que la función de los leucocitos era la secreción de sustancias microbicidas en los centros de infección. Describió los gránulos y especuló que los neutrófilos secretaban sustancias que estarían almacenadas en esos gránulos. Aunque la hipótesis más aceptada durante muchos años ha sido que la principal función de los neutrófilos era la fagocitosis y la muerte intracelular de los microorganismos fagocitados, durante los últimos años se ha aceptado que el proceso secretorio es intrínseco a las funciones normales de defensa durante la inflamación. A ello ha contribuido el mayor conocimiento del contenido y función de los gránulos.(Para una revisión ver 2)

Los neutrófilos se desarrollan a partir de células hematopoyéticas indiferenciadas de la médula ósea. En la fig. 1 se representa un esquema del proceso de maduración de los neutrófilos humanos.

MEDULA
(desarrollo: 14 días)



Maduración de los neutrófilos humanos.

Los gránulos citoplasmáticos representados en negro son los gránulos azurófilos (primarios o peroxidasa-positivos; los blancos representan los gránulos específicos (secundarios o peroxidasa-negativos).

En el estado de promielocito aparecen las granulaciones. Los promielocitos son células relativamente grandes (15 μ m de diámetro, aproximadamente). Los gránulos citoplasmáticos se tiñen de color rojo púrpura con Wright-Giemsa. Cuando maduran y pasan al estado de mielocitos, las granulaciones pierden sus propiedades azurófilas y se tiñen con colorantes ácidos y básicos (de ahí el nombre de neutrófilos).

Las granulaciones neutrófilas fueron llamadas gránulos específicos, ya que eran características de los neutrófilos y las diferenciaban de otros granulocitos como eosinófilos y basófilos, que a su vez poseen otros gránulos característicos.

La aparición secuencial de gránulos azurófilos y neutrófilos, refleja la formación de dos tipos distintos de gránulos, ambos presentes en la célula madura. Los gránulos azurófilos, formados durante la etapa de promielocito, contienen peroxidasa y permanecen en la célula a lo largo del proceso de maduración. La neutrofilia aparece cuando se produce un segundo tipo de gránulos que no poseen peroxidasa, y que finalmente son más abundantes que los azurófilos (en una proporción 2:1). Ahora se utilizan los términos primario y secundario para clasificar a los gránulos peroxidasa + y peroxidasa - , respectivamente.

El contenido de los gránulos se ha estudiado por técnicas citoquímicas y análisis bioquímico de los gránulos aislados. En la tabla I se resume la composición (2):

TABLA I

GRANULOS PRIMARIOS (AZUROFILOS)	GRANULOS SECUNDARIOS (ESPECIFICOS)
Hidrolasas ácidas	Lisozima
-glicerofosfatasa ácida	Lactoferrina
-glucuronidasa	
-N-acetil- β - glucosaminidasa	
-manosidasa	Cobalofilina (proteína que une Vitamina B ₁₂)
-arilsulfatasa	
-galactosidasa	
-5'-nucleotidasa	Colagenasa
-fucosidasa	
-proteasa ácida (catepsina)	Proteínas ácidas
Proteasas neutras	
-proteasa similar a quimotripsina	
-elastasa	
-colagenasa	
Proteínas catiónicas	
Mieloperoxidasa	
Lisozima	
Mucopolisacáridos ácidos	

Los gránulos secundarios son distintos de los lisosomas en cuanto a su contenido. La fosfatasa alcalina, considerada como un marcador de gránulos secundarios, no está asociada a ellos en humanos. En la actualidad, los marcadores específicos de secundarios son la lactoferrina y la cobalofilina.

Las colagenasas de los gránulos primarios y secundarios parecen ser distintas.

1.2.- DESGRANULACION

La desgranulación está asociada a la fagocitosis, pero no depende de ella. Se produce cuando se funde la membrana de los gránulos con la membrana de la vacuola fagocítica, con extrusión del contenido del gránulo en la vacuola. Los constituyentes de los gránulos pueden verterse también al medio extracelular durante la fagocitosis. La extensión de esta liberación extracelular depende del grado del estímulo fagocitario: del número y del tipo de partículas ingeridos, y del tipo de gránulo (ver 2) para ref.). La lisozima y la lactoferrina son más susceptibles de liberación extracelular que la peroxidasa y las hidroxilasas ácidas, por ejemplo.

Si la superficie del objeto que se va a fagocitar está opsonizada por complejos antígeno-anticuerpo, o por complemento, los neutrófilos se adhieren a ella, y se produce la desgranulación como si la superficie hubiera sido internalizada ("fagocitosis frustrada"). También se produce desgranulación extracelular cuando los neutrófilos se tratan con citocalasina B, que interfiere con los microfilamentos, con lo que las células pierden su capacidad de ingerir partículas.

La desgranulación extracelular es importante en la patología de la inflamación, ya que se han identificado diversas enzimas proteolíticas que podrían digerir los tejidos. Ciertas drogas antiinflamatorias (colchicina, corticosteroides) inhiben la desgranulación y la liberación del contenido de los gránulos fuera de la célula.

La desgranulación de los gránulos secundarios ocurre antes que la de los primarios (3). A ciertas concentraciones del ionóforo A23187, ConA, PMA y algunos metabolitos del ácido araquidónico (2, 4), se liberan principalmente los gránulos secundarios. Estos gránulos parecen ser especialmente accesibles. De hecho, los polimorfonucleares (PMN) segregan espontáneamente el contenido de los gránulos secundarios. Parece que su exocitosis es intrínseca a la participación de los neutrófilos en una respuesta inflamatoria, se produzca o no fagocitosis. Los procesos celulares que son

necesarios y suficientes para la fusión de los gránulos con la membrana plasmática y para la exocitosis no están claros. Se saben que están relacionados procesos tales como el flujo de Ca^{2+} , ensamblaje de microtúbulos, los microfilamentos, la glicólisis y el metabolismo de nucleótidos cíclicos (2) .

El contacto con la membrana plasmática no es suficiente para la fusión y exocitosis, ya que los PMN tratados con citocalasina B (que impide el ensamblaje de los microtúbulos), todavía requieren algún estímulo exógeno de superficie, como la ocupación de receptores de factores quimiotácticos, o de Fc, para que tenga lugar la desgranulación.

El Ca^{2+} (5) es necesario para obtener una desgranulación óptima en la mayoría de las condiciones experimentales. Sin embargo Smolen y Weissman (6) estudiaron la importancia relativa del Ca^{2+} intra y extracelular utilizando quelantes y antagonistas del Ca^{2+} . Pudieron observar liberación de enzimas lisosomales y producción de ión superóxido en presencia de EGTA; inhibidores de la calmodulina y el TMB-8 que inhibe la movilización del Ca^{2+} intracelular inhibían la desgranulación y la producción de superóxido estimuladas por formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP), inmunocomplejos y PMA. Estos resultados indican que es la movilización del calcio la que tiene un papel crítico en el proceso de desgranulación; aunque la entrada de calcio extracelular puede servir para amplificar la respuesta, no se requiere para su expresión. Para buscar las zonas de acumulación y movilización del calcio utilizaron técnicas de precipitación y microscopía electrónica. Sus resultados sugieren que el Ca^{2+} está almacenado en el plasmalema y se libera sólo en las regiones estimuladas de la membrana después de la interacción ligando-receptor.

No está clara la intervención de los cationes monovalentes en la desgranulación. Hoffstein (6) ha aportado pruebas a favor de que el Na^+ es necesario para la secreción de enzimas y este requerimiento de Na^+ no está relacionado con el potencial de membrana.

Los nucleótidos cíclicos modulan la respuesta secretoria pero sin actuar como segundos mensajeros. En los neutrófilos la adición de cAMP o cGMP no es suficiente para que la célula

se active. Pero la adición de cAMP exógeno y de agentes que elevan los niveles de cAMP disminuyen la desgranulación y otras respuestas celulares. La adición de cGMP y agentes que elevan el cGMP, la aumentan; estos datos sugieren un papel de los nucleótidos cíclicos en la regulación de la activación de los neutrófilos. Pero no está claro todavía si los niveles de cGMP se elevan después de la estimulación. También hay resultados contradictorios sobre el cAMP. (Para ref. ver la revisión 6). Los resultados más recientes indican un aumento transitorio de los niveles de cAMP después de la estimulación con látex, factores quimiotácticos, inmunocomplejos, A23187 (6) y zimosán revestido de complemento (7). El aumento de cAMP es anterior a la desgranulación y a la producción de superóxido.

Los nucleótidos cíclicos podrían afectar la exocitosis modulando el ensamblaje de los microtúbulos. El isoproterenol y las prostaglandinas, que aumentan los niveles de cAMP disminuyen el ensamblaje de microtúbulos y la movilización de los gránulos. PG F₂ y PMA, que elevan el cGMP, aumentan el ensamblaje y la movilización de los gránulos (6).

No se conoce bien el papel del flujo de aniones en neutrófilos. En otras células los agentes que bloquean el flujo de aniones bloquean la secreción. Korchak y cols. (8) vieron que en PMN humanos, la desgranulación estimulada por inmunocomplejos o A23187 era inhibida por inhibidores del transporte de aniones, pero estos inhibidores no tenían una acción específica.

La desgranulación afecta a las propiedades de la membrana. Causa, por ejemplo, una neutralización de la carga de la superficie celular. Este cambio está asociado con una mayor adhesividad. Además, la exocitosis de los gránulos secundarios está asociada a un aumento en el número de receptores de péptidos quimiotácticos. Se ha propuesto que la liberación de los gránulos secundarios puede producir un nuevo suministro de receptores quimiotácticos libres, que permitiría la continuación de las respuestas migratorias de los neutrófilos. Sin embargo, también se ha observado disminución de la respuesta. La mayor adhesividad y menor respuesta a factores quimiotácticos puede servir para que los neutrófilos dejen de vagabundear y se queden en el centro de inflamación

donde tienen que cumplir su misión fagocítica y microbicida.

Durante el desarrollo del neutrófilo (paso del estado de promielocito a mielocito) hay una síntesis de proteínas muy activa , pero no en el PMN maduro, que no puede volver a reconstruir sus gránulos una vez que los ha liberado. La secreción de gránulos se detecta pocos minutos después de la exposición del PMN al estímulo adecuado (in vitro) y es máxima a los 30 minutos generalmente (2)

La lisozima, lactoferrina y cobalamina, contenidas en los gránulos secundarios, tienen propiedades antimicrobianas. La lisozima lisa la pared bacteriana de varias bacterias gram positivas; el efecto inhibitorio de la lactoferrina puede residir en la quelación de las trazas de hierro necesarias para la proliferación de ciertas bacterias.(2).

En resumen, la respuesta secretoria del PMN libera substancias antimicrobianas al medio extracelular, proporciona mecanismos para la amplificación y modulación de las respuestas inflamatorias, influye en el comportamiento de otras células inflamatorias especializadas implicadas en el reconocimiento inmune específico y puede proporcionar señales que inhiban la producción de PMN en la médula ósea.

Hasta ahora hemos comentado la función secretoria del PMN. En el siguiente apartado vamos a estudiar el aspecto fagocitario.

Un fagocito (neutrófilo, eosinófilo o monocito) sigue su camino para encontrarse con la partícula que va a fagocitar por quimiotaxis y migra hacia ella siguiendo un gradiente de concentración. Una vez que encuentra el objeto, empieza el proceso de fagocitosis. El objeto puede ser recubierto por proteínas derivadas del huésped y el PMN lo reconoce como una sustancia de la cual hay que deshacerse. Estas proteínas (opsoninas) son inmunoglobulinas y factores del complemento y se cree que son reconocidas por receptores específicos presentes en la membrana del neutrófilo. Una vez que el objeto es identificado, es ingerido y empieza su destrucción.

La energía que necesita el PMN para la ingestión la obtiene del ATP producido en la glicolisis anaerobia. No influyen sobre ella ni la hipoxia ni los inhibidores de la fosforilación oxidativa como KCN.

La acción bactericida implica una serie de mecanismos que se ponen en marcha por dos acontecimientos : la desgranulación, de la que ya hemos hablado, y la iniciación de la explosión oxidativa. Vamos a comentar con más detalle las fases de quimiotaxis y explosión oxidativa.

1.2.- QUIMIOTAXIS

La quimiotaxis es la migración dirigida de las células a lo largo de un gradiente. (Para una rev. ver 10 y 11). Los factores quimiotácticos estimulan el ensamblaje y la organización de los microtúbulos y la localización de los microfilamentos. Se piensa que los microtúbulos pueden ser necesarios para la orientación y dirección de la locomoción, mientras que los microfilamentos pueden requerirse para la contracción.

La primera fase de la quimiotaxis es "sensorial": se genera una señal por la interacción entre el factor quimiotáctico y su receptor. Las bacterias detectan diferencias de concentración respecto del tiempo mientras que los PMN detectan fundamentalmente diferencias de concentración del agente quimiotáctico a lo largo de sus dimensiones.

Existen mecanismos de adaptación al estímulo. Cuando los PMN se ponen en presencia de una cierta dosis de factor quimiotáctico no responden a una nueva estimulación con una concentración igual o ligeramente mayor, pero sí responderán de nuevo si se eleva suficientemente la concentración de estímulo. Esta adaptación es necesaria para que las células migren en un gradiente de concentración (10). Algunos autores (12) piensan que la adaptación es compatible con una disminución de la afinidad del receptor por el FMLP debido a la existencia de cooperatividad negativa y/o a la inducción de una expresión selectiva de una población heterogénea de receptores.

Los PMN son atraídos por una gran variedad de sustancias: factores del complemento C567, C3a, C5a y C8 convertasa son quimiotácticos, así como péptidos formilados (13) factor activante de plaquetas (14) y metabolitos derivados del ácido araquidónico (15): el ácido 5,12-dihidroxiicosatetraenoico es activo a 10^{-9} M mientras que 5,11,-dihidroxi y 12-hidroxiicosatetraenoico son menos activos y necesitan concentraciones más altas (10^{-6}).

Los péptidos formilados se han usado mucho en el estudio de la quimiotaxis. Están relacionados con factores quimiotácticos liberados por bacterias. Los péptidos más potentes son los que tienen un residuo aromático en la posición C-terminal.

La gran especificidad de estos compuestos sugirió que sus efectos estaban mediados por un receptor ($K_d=10^{-9}$ M). Los polimorfonucleares hidrolizan los péptidos formilados. Esto sugiere que una proteasa puede disociar el péptido del receptor después de generar la señal, con lo que los receptores volverían a estar disponibles para detectar nuevas moléculas de péptido. Recientemente Kelson (16) ha encontrado que otro tipo de enzima, la fosfolipasa C, aumenta la capacidad de unión del péptido quimiotáctico en PMN humanos, aumentando el número de receptores específicos para el péptido, pero sin aumentar la unión de C5a.

Si el complejo ligando-receptor no es hidrolizado, puede ser internalizado. Este proceso es tiempo y temperatura dependiente.

No existe una relación clara entre el número de receptores disponibles y la respuesta quimiotáctica. Por ejemplo, la exposición de PMN a un factor quimiotáctico derivado del complemento causó una desactivación preferencial (17): las células perdieron la capacidad de respuesta tanto a ese estímulo como al péptido formilado, aumentando el número de receptores. La exposición previa al péptido quimiotáctico, sin embargo, produjo una pérdida de centros de unión al péptido y provocó una desactivación preferente: disminuyó más la respuesta al péptido que al factor del complemento. La exposición del neutrófilo a bajas concentraciones de estímulos desgranulantes (18) como el ionóforo, aumentó el número de receptores y redujo la afinidad aparente.

Los PMN de caballo son capaces de responder quimiotácticamente a C5a pero no responden a ninguno de los péptidos N-formilados, a pesar de que poseen receptores con alta afinidad para los péptidos quimiotácticos en la superficie celular. Aunque no son capaces de iniciar la quimiotaxis, el receptor media la producción de superóxido y la secre-

ción de enzimas lisosomales. El número de receptores que posee el neutrófilo de caballo es sólo 1/10 del número de receptores de otras especies. Tal vez este comportamiento se deba a que no hay una densidad suficiente de receptores para percibir un gradiente quimiotáctico (11).

La fagocitosis de zimosán (19) inhibe la unión del péptido a su receptor, y esta inhibición parece estar mediada por la oxidación de grupos tioles.

La interacción entre el factor quimiotáctico y el receptor genera una señal que se transmite produciéndose el movimiento direccional de la célula. Existen ciertos cambios mediados por receptores, rápidos y transitorios, que podrían tener un papel importante en la amplificación de la señal, tales como rápidas alteraciones en el potencial de membrana, cambios en el flujo iónico, en los niveles de nucleótidos cíclicos, metilación de proteínas y fosfolípidos, fosfolipasa A_2 y metabolismo del ácido araquidónico.

La quimiotaxis es óptima en presencia de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . Marasco y cols. (20) han confirmado experiencias anteriores de que los cationes divalentes no son necesarios para la orientación pero sí para la locomoción. Los PMN se movían mejor en un medio con magnesio que en un medio con calcio y magnesio. En sus experimentos, la quelación del magnesio abolía totalmente la locomoción en una cámara de Zigmon. Sin embargo otros autores, que utilizan cámaras de Boyden, consideran que el calcio es esencial para la máxima respuesta quimiotáctica.

Los factores quimiotácticos producen rápidas alteraciones en el flujo de cationes monovalentes y la activación de una ATPasa Na^+-K^+ dependiente. El papel del Ca^{2+} no está aún bien definido: aumenta la permeabilidad al calcio y se libera calcio internamente unido a membranas al estimular con péptidos quimiotácticos. Los cambios de permeabilidad se bloquean con inhibidores de la lipooxigenasa, pero no la liberación de calcio intracelular (21). Becker y cols. (22) han sugerido que la movilización del calcio inducida por factores quimiotácticos y el metabolismo del ácido araquidónico están relacionados.

No está claro si se requieren variaciones de nucleótidos cíclicos y fosforilación de proteínas para la quimiotaxis. La carboximetilación de proteínas parece estar implicada en la quimiotaxis de neutrófilos de conejo (23) pero no se ha demostrado en neutrófilos ni en macrófagos humanos. La metilación de fosfolípidos parece ser también importante en la quimiotaxis de monocitos (24) y neutrófilos (25).

1.3.- EXPLOSION OXIDATIVA

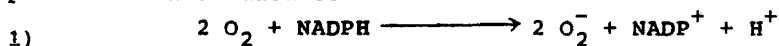
Es una ruta metabólica que no funciona cuando la célula está en reposo. Su función es producir un grupo de agentes altamente reactivos mediante reducción parcial del O_2 . (Para una revisión ver 2,26 y 27)

Lo primero que se supo de esta ruta fue que al estimular se producía un gran aumento del consumo de oxígeno (28) cuya misión no era proporcionar energía para la fagocitosis (29); parte de él, al menos, era convertido en H_2O_2 .

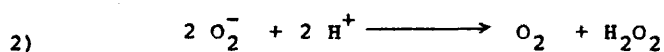
La explosión oxidativa consiste en el aumento de:

- consumo de O_2
 - producción de anión superóxido O_2^- ,
 - producción de H_2O_2
 - actividad de la ruta de Embden-Meyerhoff de la glicolisis.
- Esta ruta se activa durante la fagocitosis de bacterias y partículas de zimosa opsonizadas, esferas de látex, estimulación con PMA, ionóforo. Sólo requiere contacto con el estímulo y energía.

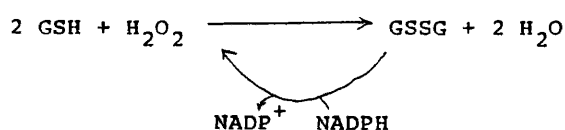
Aunque hay cuatro procesos distintos, parece que todos dependen de una única actividad enzimática, ya que en la enfermedad granulomatosa crónica todas están abolidas. Esta enzima es la que cataliza la reducción de O_2 a O_2^- . Ha habido una gran controversia sobre si el donante de electrones era NADPH o NADH. Babior en su revisión explica las razones que inclinan la balanza hacia el NADPH. La reacción catalizada por la NADPH oxidasa es



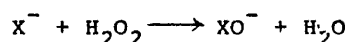
El peróxido de hidrógeno se produce mediante la acción de la superóxido dismutasa:



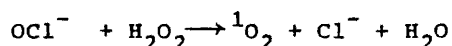
La activación de la ruta de las hexosasmonofosfato tiene lugar gracias al aumento de $NADP^+$ durante la explosión oxidativa. Además de la reacción (1) hay otra fuente de $NADP^+$; el sistema peroxidasa-reductasa del glutatión, que es responsable de la eliminación del H_2O_2 .



La acción bactericida del H_2O_2 resulta muy potenciada en presencia de un halógeno (Cl_2 , I^-) y el enzima mieloperoxidasa, que abunda en los gránulos primarios.



Se pensó que el mecanismo por el que morían las bacterias era debido a la halogenación de la pared, o a la descarboxilación de los aminoácidos con producción de aldehídos tóxicos. La hipótesis más reciente propone la muerte de los microorganismos debida a la acción del singlete de oxígeno ($^1\text{O}_2$)



Se han descrito cinco anomalías genéticas que afectan alguna de las enzimas implicadas:

- La enfermedad granulomatosa crónica, en la que es inactiva el enzima que forma O_2^-
- La deficiencia severa de glucosa -6-P deshidrogenasa
- La deficiencia de mieloperoxidasa
- La deficiencia de la glutathion reductasa y de la peroxidasa

Las dos primeras se manifiestan como infecciones recurrentes que empiezan en la niñez. Como regla general, las dos siguientes deficiencias no producen problemas de infección grave y hay dudas respecto a la gravedad de la quinta.

1.4.- MEMBRANAS

Los tres componentes mayoritarios de las membranas son proteínas, lípidos y oligosacáridos.

El modelo que se ajusta más a los resultados experimentales es el del mosaico fluido (31). en condiciones fisiológicas no sólo los lípidos están en un estado fluido y pueden desplazarse ; las proteínas intrínsecas insertas en la bicapa lipídica pueden difundir lateralmente a velocidades que dependen de la viscosidad de la membrana.

Las dos caras de la membrana no son idénticas en su composición. Los oligosacáridos, por ejemplo, están dispuestos sólo en la cara externa de la membrana plasmática. Las proteínas y lípidos tampoco están distribuidos de manera simétrica . Por ejemplo, la mayor parte de la esfingomielina y la fosfatidilcolina están localizados en la cara externa de la membrana, mientras que fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina se encuentran en el lado citoplasmático de la membrana del eritrocito.

La composición química de una membrana no es necesariamente constante a lo largo del tiempo : varía con el estado de diferenciación, la dieta y la administración de hormonas o drogas.

Los lípidos y proteínas de membrana se recambian a distinta velocidad. Los fosfolípidos tienen una velocidad de recambio más rápido que las proteínas.

En la práctica, para medir el recambio de fosfolípidos se mide la degradación de moléculas previamente marcadas en vez de determinar la velocidad de incorporación de precursores. De esta manera, se evitan complicaciones debidas a fluctuaciones en el tamaño y actividades específicas de los "pools" de precursores. En ambos casos hay que distinguir entre el recambio neto y las reacciones de intercambio isotópico.

Todos los lípidos de membrana son anfipáticos. Las cuatro clases que aparecen en membranas eucarióticas son:

- Glicerofosfátidos: la molécula de glicerol está esterificada con ácidos grasos de cadena larga. El grupo fosfato está unido a una base de cadena corta o al mioinositol.
- Esfingolípidos: El esqueleto es una molécula de esfingo-

sina.

-Glicolípidos: La base es una ceramida a la que este-
rifica en el -OH del carbono uno hexosas o polisacáridos
complejos.

-Esteroles entre los cuales el colesterol es el más repre-
sentativo.

A grandes rasgos, la composición y proporción de
las distintas clases de fosfolípidos de los leucocitos
periféricos es bastante parecida a la de la mayoría de
las células de mamíferos. Una diferencia es su mayor con-
tenido en glicolípidos. De todos modos, la mayoría de los
estudios analíticos se ha realizado en células completas
debido a que un buen fraccionamiento subcelular es difícil
de conseguir; por eso la información sobre diferencias a
nivel subcelular es escasa. En membrana plasmática hay un
relativo enriquecimiento de colesterol, glicolípidos y fos-
folípidos, especialmente esfingomelina. Las vacuolas fago-
cíticas de polimorfonucleares de *C. cobaya* son ricas en
colesterol libre, y contienen también mayor cantidad de
fosfolípidos por miligramo de proteína que las células
totales. También hay más fosfatidilinositol y una mayor
proporción de lecitinas disaturadas que en las membranas
de células enteras (32).

La velocidad a la que la membrana plasmática se sin-
tetiza no varía drásticamente cuando las células atraviesan
periodos de intensa actividad (33). Goodall y cols. demos-
traron que la membrana plasmática eliminada de la superficie
celular durante la fagocitosis era reemplazada incluso
cuando la síntesis de proteínas estaba bloqueada, sugirien-
do que existe una reserva celular de algunas proteínas de
membrana plasmática. (34)

Los fosfolípidos pueden ser transferidos de unas mem-
branas a otras mediante proteínas específicas, pero es
dudoso que estas reacciones de intercambio contribuyan a la
síntesis neta de membranas (33,35).

Los fosfolípidos más abundantes de la membrana son
fosfatidilcolina y fosfatidiletalona.

La composición de membranas de neutrófilos no estimu-
lados es según Serhan y cols. (36): fosfatidilcolina 40.4%

fosfatidiletanolamina 34.1%, fosfatidilserina 9.9%, esfingomielina 9.9%, fosfatidilinositol 6.0%, fosfatidato 0.12% y cardiolipina 0.11%.

La fosfatidilcolina puede sintetizarse (ver esquema) por dos vías principales, la de la CDP-colina (37-38) y la de la transmetilación (39-40).

La primera ruta implica la transferencia de fosfocolina a partir de la CDP-colina (37,38) y la de la transmetilación (39,40).

La primera ruta implica la transferencia de fosfocolina a partir de la CDP-colina a una molécula de diglicérido. La enzima que cataliza esta reacción es la CDP-colina: 1,2-diacilglicerol fosfocolinatransferasa (EC.2.7.8.2). La segunda vía consiste en la adición de tres grupos metilo al grupo amino de la molécula de fosfatidiletanolamina, siendo la S-adenosil-L-metionina (AdoMet) el donante de grupos metilo. La enzima encargada de catalizar esta reacción es la S-adenosil-L-metionina : fosfatidiletanolamina-N-metiltransferasa. En el hígado de rata ambas enzimas están localizadas principalmente en la fracción microsomal.

La fosfatidilcolina se puede sintetizar además por acilación de una lisofosfatidilcolina (41) o por intercambio de base (42).

1.5.- TRANSCOLINACION

La enzima que transfiere fosfocolina parece ser distinta a la que transfiere fosfoetanolamina. La enzima CDP-colina: 1,2-diglicérido fosfocolina transferasa de hígado de rata tiene pH óptimo 6.5-7.5 (37).

La CDP no puede ser sustituida por ADP, UDP ni GDP-colina y aunque dCDP-colina puede ser sustrato, carece de importancia a nivel fisiológico. La reacción está totalmente bloqueada por los iones calcio y magnesio (43).

En hígado de rata, las dos transferasas poseen distinta especificidad de sustrato (44). La fosfocolina transferasa no muestra especificidad por diglicéridos con distintos grados de insaturación. Los ácidos grasos en posición 1 de los diglicéridos utilizados por la fosfocolinatransferasa varían del láurico al heptadecanoico, pero con la fosfoetanolaminatransferasa se introducen peor los ácidos menores de 17:0 (45).

La CDP-etanolamina inhibe la fosfocolinatransferasa y la CDP-colina, la fosfoetanolaminatransferasa (46). Ambas reacciones pueden ser inhibidas por D- o L-serina formándose en este caso fosfatidilserina.

Cuando se incuban con CMP las dos enzimas catalizan la reacción inversa liberando diglicérido y CDP-base. La actividad de la reacción inversa es mayor en el caso de la fosfocolinatransferasa.

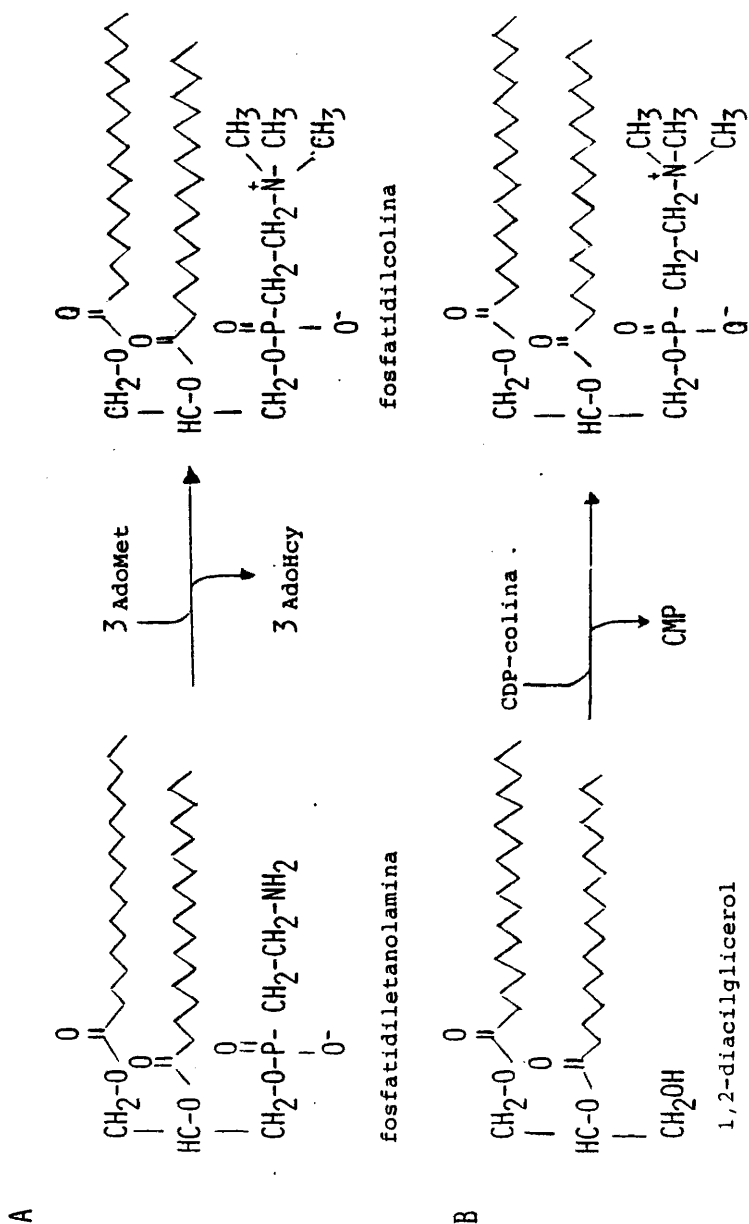
La fosfocolinatransferasa requiere magnesio y el manganeso puede reemplazarlo parcialmente. En el caso de la fosfoetanolaminatransferasa el manganeso es más efectivo que el magnesio. El calcio y el bario son inhibidores (37). Las dos enzimas son estimuladas por deoxicolato, y la fosfocolinatransferasa es más sensible al tratamiento con otros detergentes. Mientras que la fosfocolinatransferasa es estimulada por fosfolípidos, la otra enzima es inhibida. Las etapas previas de la síntesis de fosfatidilcolina a partir de colina están representadas en el esquema.

En hígado de rata (47) la colina quimasa está localizada en el sobrenadante de 100.000g y es ligeramente más baja en el adulto que en los fetos cinco días antes del nacimiento para después bajar.

La citidiltransferasa está en el sobrenadante y en

SINTESIS DE FOSFATIDILCOLINA POR TRANSMETILACION (A)

Y TRANSOLINACION (B)



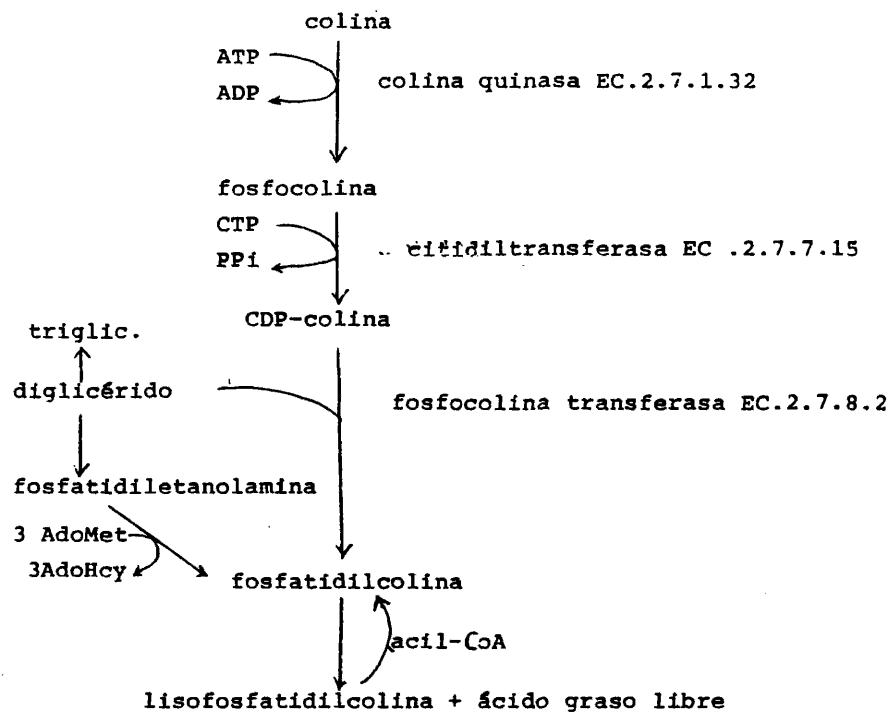
microsomias. La actividad varía con la edad del animal. La fosfocolinatransferasa, cinco días antes del nacimiento, tiene una actividad de sólo un 10% de la actividad en estado adulto.

Vance y Choy (48) han revisado la regulación de la síntesis de fosfatidilcolina. La formación de fosfocolina no parece ser la etapa limitante. En hígado y pulmón de rata (49), en células HeLa (50) en hepatocitos cultivados (51), y en corazón de hámster (52), el paso limitante parece ser la formación de CDP-colina.

La citidiltransferasa se encuentra tanto en la fracción soluble como en la microsomal de hígado de rata. En la fracción soluble existe en dos formas de distinto peso molecular; la de mayor peso molecular necesita lípidos, preferentemente lisofosfatidiletanolamina para su máxima actividad (53), también activan (in vitro) fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico. La citidiltransferasa microsomal es estimulada por niveles bajos de lisofosfatidilcolina e inhibida a concentraciones altas (54).

Se han propuesto tres mecanismos para la regulación de la citidiltransferasa. La actividad de esta enzima puede estar regulada por la concentración de sustrato en células HeLa (50), por la concentración de lisofosfatidiletanolamina en hígado de rata (55), por el fosfatidilglicerol en pulmón (56, 57) y en hígado de gallo por la fosfocolina (58).

Los requerimientos de iones son distintos según el sistema utilizado. En la espinaca, los requerimientos de magnesio y manganeso son comparables pero en semilla de ricino, el magnesio es nueve veces más activo que el manganeso (59).



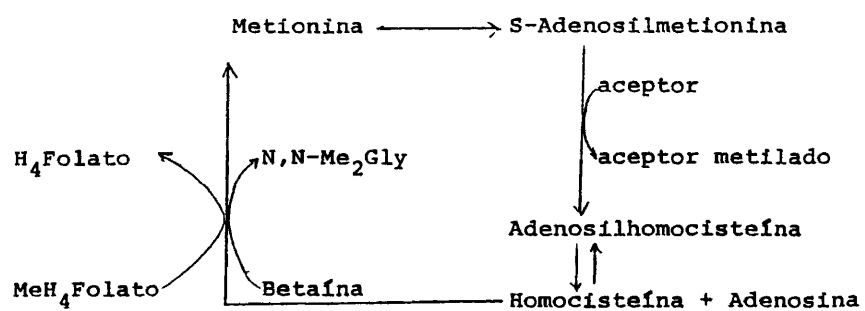
1.6.- TRANSMETILACIÓN

Es la ruta catalizada por la S-adenosil-L-metionina: fosfatidiletanolamina- N-metiltransferasa (PMT). La PMT se ha estudiado en muchos sistemas. En eritrocitos (60) se encuentra asociada a membranas plasmáticas, pero en general (hígado (61, 62), médula adrenal (63), Neurospora Crassa (64)) se encuentra asociada a microsomas.

La actividad de la PMT en microsomas de hígado de rata es 500-1000 pmol/min/ mg proteína (61, 62). La actividad de la fosfocolina-transferasa es aproximadamente 1000 pmol/min/mg proteína en ese órgano. Pero la síntesis de fosfatidilcolina por transmetilación requiere la transferencia de tres grupos metilo, por lo que esta ruta es unas tres veces menos eficiente que la de la CDP-colina en hígado de rata. Estos datos concuerdan con los de Sundler y cols. (65), quienes calcularon que el 20-40% de fosfatidilcolina se sintetiza por transmetilación en dicho órgano. Esto significa que en células o tejidos en los que la actividad de la transmetilación es 1-0.1% de la de hígado de rata, sólo sintetiza un 0.5% de fosfatidilcolina por transferencia de grupos metilo, por lo que, aunque en hígado la transmetilación tiene un papel en la síntesis de fosfolípidos, no ocurre lo mismo en otros sistemas.

La adenosilhomocisteína es un metabolito de todas las metilaciones mediadas por S-adenosil-L-metionina, y es un potente inhibidor competitivo de la PMT. La afinidad de la mayoría de las PMT es mayor por la S-adenosilhomocisteína que por la S-adenosil-L-metionina (66, 67). Por lo tanto las concentraciones relativas AdoMet/AdoHcy pueden regular las reacciones de N-metilación. Hoffman y cols. (68) encontraron que, en hígado de rata, al disminuir la relación AdoMet/AdoHcy se inhibe la PMT mientras que la adición de bromobenceno, que aumenta dicha relación al disminuir los niveles de AdoHcy, aumenta la metilación.

La AdoHcy resultante de una reacción de transmetilación se degrada rápidamente a adenosina y homocisteína. La homocisteína se recicla a metionina vía metiltetrahidrofolato y/o betaína metiltransferasa, produciendo dilución de la actividad específica de la AdoMet intracelular.



Metabolismo de la S-adenosilmetionina

Activación de la metilación de fosfolípidos en diversos sistemas

SISTEMA	ESTIMULO	AUTOR y REF.
hepatocitos rata	glucagon	Geelen. (1979) (71) Castaño. (1980) (62)
microsomos "	cAMP, ATP	Mato 1982 (72)
" "	vasopresina, angiotensina II A23187	Alemaný 1982 (73)
mastocitos	punteo recep tores IgE	(74), (75) Ishizaka 1980, 1981
"	Con A	Hirata 1979 (76)
linfocitos	Con A	Hirata 1980 (77) Moore 1982 (78)
reticulocitos	isoproterenol	Hirata 1979 (79)
glioma rata	isoproterenol	Munzel 1982 (80)
c. Leydig rata	gonadotropina 8-Br-cGMP toxina cólera	Nieto (81)
glándula pineal	adrenalina	Saavedra 1980 (82)
D. discoideum	cGMP, Ca ²⁺	Alemaný 1980 (83) García Gil 1980 (84)
extractos pituitaria	vasopresina	Prasad 1981 (85)
RBL	Ig E	Crews 1980 (86)
c. hamster cultivo	transformación vírica	Mazière 1981 (87)
miocardio rata	L-tiroxina	Limas 1980 (88)
neuritis rata	factor crecimiento nervio	Pfenninger (89)
tumor pituitaria	factor liberador corticotropina	Hook 1982 (90)
cristalino pollo	diferenciación	Zelenka 1982 (91)

Inhibición de la metilación de fosfolípidos en diversos sistema

SISTEMA	ESTIMULO	AUTOR y REF.
leucocitos conejo	factores quimiotácticos	Hirata 1979 (25)
macrófagos	"	Pike 1979 (24)
plaquetas	trombina	Shafftil 1979 (92)
leucocitos ratón	inductores diferenciación	Honma 1981 (93)

Se ha sugerido que existen dos metiltransferasas: una, encargada de la introducción del primer metilo, y una segunda que introduciría los dos siguientes (60, 63). Existe una controversia acerca de esto. Otros autores (61, 62) son partidarios de la existencia de una sola PMT. El requerimiento de Mg^{2+} es variable según los sistemas.

Una de las evidencias más fuertes a favor de la existencia de dos PMT se ha obtenido en basófilos de conejos leucémicos (69). A bajas concentraciones de S-adenosil-L-metionina, extractos de RBL incorporan grupos metilos en fosfatidil-N-monometiletanolamina principalmente, y a concentraciones más altas, en fosfatidilcolina. Se han aislado variantes que introducen bien el primer metilo, pero sólo poseen el 20% de la capacidad de introducir el 2º metilo en fosfatidil-N,N-dimetiletanolamina y fosfatidilcolina (respecto a la línea paterna). Otra variante sólo es capaz de un 18% de introducción del primer metilo pero puede metilar fosfatidil-N-monometiletanolamina y fosfatidil-N,N-dimetiletanolamina para sintetizar fosfatidilcolina. La reconstitución mediante fusión de las dos variantes produjo una metilación normal.

Una gran variedad de estímulos producen aumento o disminución de fosfolípidos metilados en diversos sistemas. Un resumen de los datos están recogidos en las dos tablas siguientes.

No parece existir un mecanismo único para la modulación de la PMT. Se han sugerido cAMP, cGMP, Ca^{2+} , Mg^{2+} y una interacción directa receptor-enzima.

Se ha sugerido que la N-metilación podría tener un papel importante en la transducción de señales que actúan en la membrana celular, ya que la N-metilación aumenta cuando se ocupan los receptores beta en reticulocitos, con glucagón en hepatocitos, al estimular la mitogénesis de linfocitos con ConA y de mastocitos con IgE.

Utilizando inhibidores de la transmetilación Pike y cols. (70) sugirieron que la metilación era necesaria para la transducción de señales en monocitos después de la unión de péptidos quimiotácticos al receptor, lo cual llevaba a una conformación móvil de la célula y a la liberación de ácido araquidónico.

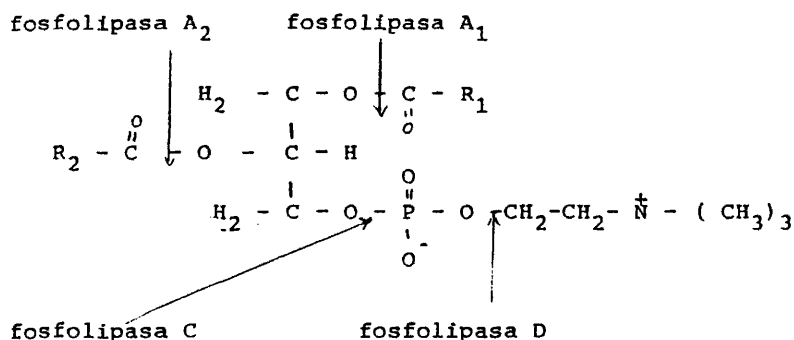
Hirata y Axelrod (⁹⁴) han propuesto que la ruta de la transmetilación podría proporcionar moléculas de fosfatidilcolina ricas en araquidonato. Sin embargo el ácido araquidónico liberado puede provenir no sólo de la acción de una fosfolipasa A₂ sobre fosfatidilcolina, sino también de fosfatidilinositol mediante la acción de una fosfolipasa C o de la fosfolipasa A₂.

Muchos tejidos (ver rev. Michell 1975) como cortex cerebral, páncreas, glándulas parótidas etc. experimentan un aumento del recambio del fosfatidilinositol cuando son estimulados para producir secreción.

Karnovsky y Wallach (⁹⁶) demostraron que la incorporación de ³²P en ácido fosfatídico y fosfatidilinositol era más rápida en leucocitos polimorfonucleares durante la fagocitosis que en estado de reposo. Más tarde Sastry y Hokin (⁹⁷) demostraron que la incorporación de inositol marcado en fosfatidilinositol también aumentaba durante la fagocitosis. Sus resultados indicaban que el aumento de incorporación de ³²P en fosfatidilinositol no era el resultado de una mayor actividad específica del ácido fosfatídico, precursor del fosfatidilinositol. Los trabajos de Tou y Stjernholm (⁹⁸) en polimorfonucleares de cobaya señalaban que el aumento de radiactividad en fosfatidilinositol y sus derivados mono y difosforilados se debían a una mayor velocidad de la síntesis de estos fosfolípidos durante el tiempo de marcaje.

El mecanismo mediante el cual los distintos efectores aumentan el recambio del fosfatidilinositol no se conoce bien, pero no es la adenilato ciclasa. Michell (⁹⁵) sugirió que el aumento del recambio del fosfatidilinositol estaba asociado con una variación en el metabolismo del Ca²⁺, produciéndose un incremento en la entrada o movilización del Ca²⁺ del interior de la célula, dando lugar a un aumento del Ca²⁺ intracelular.

En el esquema se representan los enlaces que hidrolizan los distintos tipos de fosfolipasas:



La actividad de fosfolipasa A (EC 3.1.1.4) se ha encontrado en casi todas las células en las que se ha buscado. Su localización celular no está restringida a un sólo sitio. Para ver una revisión sobre fosfolipasas, ver van den Bosch 1980 (??).

La fosfolipasa A₂ de leucocitos polimorfonucleares está asociada principalmente a membranas de los gránulos tanto azurófilos como específicos, y también está asociada a otras membranas, como la plasmática (209). En este caso, presenta dos pH óptimos uno entre pH 7-8 y otro a 5.5.

Como resultado de la acción de una fosfolipasa A se produce un ácido graso libre y un lisofosfolípido. Los lisofosfolípidos tienen propiedades detergentes, por lo que, para evitar la acumulación de lisofosfolípidos en la membrana, su recambio metabólico debe estar estrictamente controlado. Los lisofosfolípidos pueden ser degradados por una lisofosfolipasa o pueden ser reacilados mediante una lisofosfolípido: acil-CoA transferasa para formar un nuevo diglicérido.

Se han descrito (99) varios mecanismos de regulación de fosfolipasas A. Algunas existen en forma de zimógeno; otras es tán asociadas a proteínas no enzimáticas, como la calmodulina. El Ca^{2+} , ciertas hormonas y cambios en la estructura de la membrana modulan otras fosfolipasas A. Por ejemplo los glucocorticoides inducen unas proteínas denominadas macrocortina en el caso de los macrófagos y lipomodulina en neutrófilos (100).

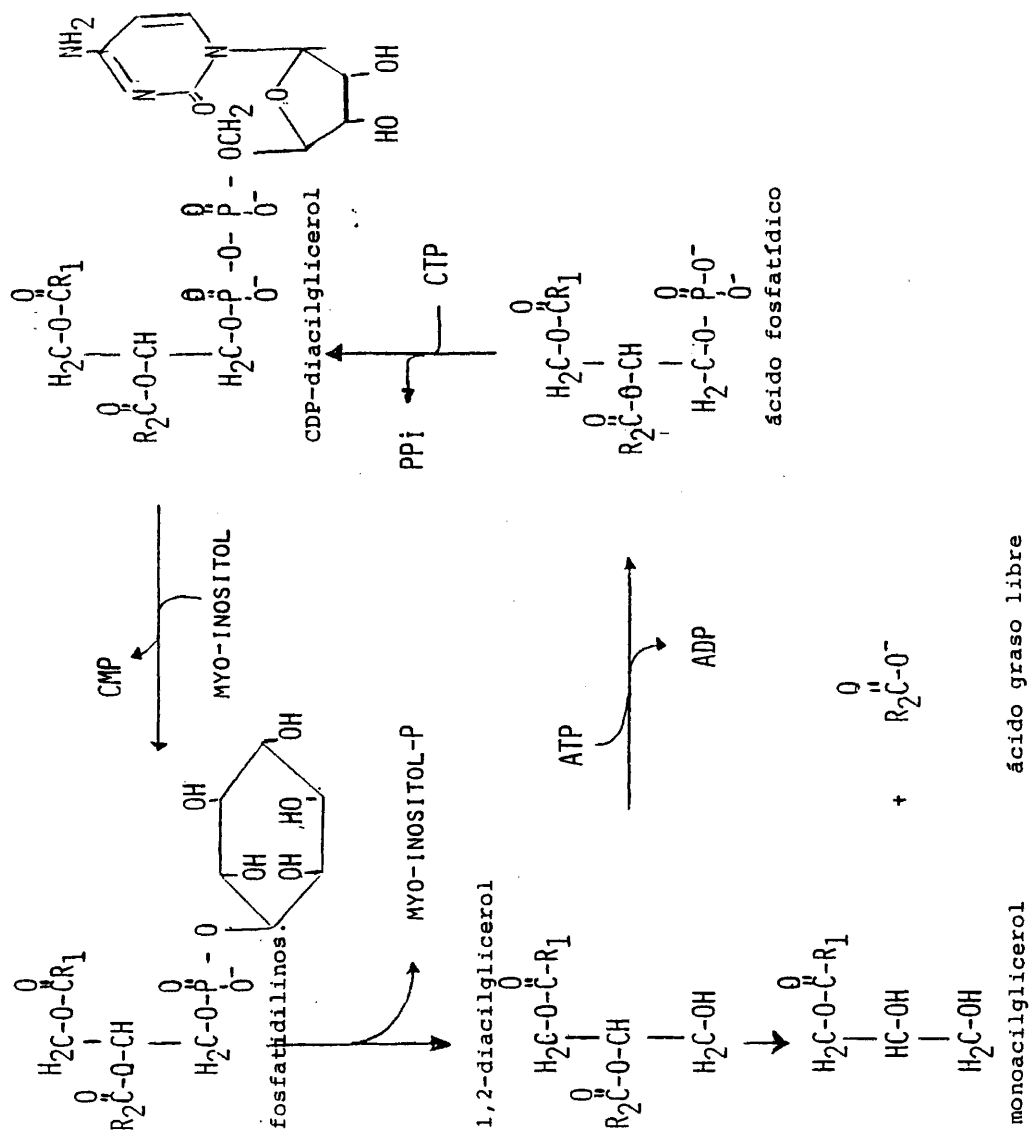
Estas proteínas inhiben las fosfolipasas. La lipomodulina tiene 40.000 D de peso molecular y la macrocortina 15.000 D pero Irvine (403) ha sugerido que puede tratarse de la misma proteína y que el peso molecular de la macrocortina podría ser de 40.000 D también, aunque fragmentos más pequeños retienen parte de la actividad biológica.

Los esteroides posiblemente ejercen su acción inflamatoria evitando la liberación de ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos, y su posterior conversión a prostaglandinas.

Las fosfolipasas pueden tener un papel en la regulación de procesos tales como secreción, quimiotaxis, movilización del Ca^{2+} y síntesis de prostaglandinas.

La fosfolipasa C se había descrito sólo en bacterias, pero se ha demostrado la existencia de una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol en varios tejidos de mamíferos. A diferencia de las fosfolipasas C bacterianas, la de lisosomas de hígado de rata no requiere cationes divalentes ni es inhibida por EDTA. El pH óptimo es ácido mientras que la de bacterias tiene pH óptimo neutro o ligeramente alcalino (403). Takenawa y cols. (404) han logrado purificar 4310 veces la fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol en hígado de rata.

ciclo del fosfatidilinositol



1.7.- METABOLISMO DEL FOSFATIDILINOSITOL

El fosfatidilinositol (ver ciclo) se sintetiza de novo en el retículo endoplásmico, pero una porción significativa de la síntesis de la región polar ocurre en la superficie de la célula, lo que sugiere que los derivados polifosforilados pueden tener una función especial en esta localización (95).

El paso inicial del recambio del fosfatidilinositol es la hidrólisis de PI, a la que sigue su resíntesis. Una fosfolipasa C específica para PI cataliza su hidrólisis y la formación de 1,2-diacilglicerol e inositol-fosfato. El diacilglicerol es fosforilado rápidamente para formar ácido fosfatídico, que vuelve a dar lugar a fosfatidilinositol utilizando CDP-diacilglicerol como intermediario.

Se ha encontrado en microsomas de pulmón de conejo un enzima que cataliza específicamente la incorporación de inositol en PI por una vía que no depende de CDP-diacilglicerol. Su papel se desconoce (105).

El recambio metabólico del PI es estimulado por la unión de una gran variedad de ligandos a sus receptores de membrana. Michell (95) descubrió que el metabolismo del fosfatidilinositol es disparado por aquellos receptores que controlan un aumento en el Ca^{2+} citosólico; el Ca^{2+} actúa luego como segundo mensajero estimulando la respuesta funcional de la célula. Michell observó que el aumento del metabolismo del PI en una gran variedad de células no parecía ser dependiente del aumento del Ca^{2+} citosólico, mientras que la respuesta celular sí lo era. Esta observación se basaba en cuatro líneas de evidencia: 1) la eliminación del Ca^{2+} extracelular bloqueaba la respuesta funcional pero no el recambio del fosfatidilinositol; 2) la entrada de calcio en la célula mediante un ionóforo provocaba la respuesta funcional pero no el recambio del fosfatidilinositol; 3) ciertas drogas que antagonizaban la entrada de calcio en la célula no afectaban el metabolismo del PI pero abolían la respuesta y 4) las relaciones dosis-respuesta mostraban que la hidrólisis del fosfatidil se correlacionaba mejor que la respuesta funcional con la ocupación de receptores.

Estas observaciones sugerían que la hidrólisis del PI precedía la entrada de Ca^{2+} dentro de las células y Michell supuso que podría ser un mecanismo universal de la apertura de los canales de Ca^{2+} .

La hipótesis de Michell ha sido apoyada por un gran número de trabajos en tipos de células. Sin embargo han empezado a aparecer datos contradictorios. Hawthorne (106) opina que no puede mantenerse la hipótesis del papel universal del fosfatidilinositol en la movilización del Ca^{2+} porque hay varios sistemas en los que la hidrólisis del PI requiere Ca^{2+} externo. Esto, sin embargo, no afecta a la hipótesis de Michell en su totalidad, ya que el hecho de que exista requerimiento de Ca^{2+} extracelular no prueba que la hidrólisis del PI no controle una variación en los niveles de Ca^{2+} citoplasmático.

Cockcroft (107) ha clasificado los sistemas en tres tipos según el estímulo que provoca la hidrólisis del PI sea dependiente de Ca^{2+} , de la ocupación del receptor o de ambos.

La hidrólisis de PI en neutrófilos de conejo estimula dos con péptido quimiotáctico, en presencia de citocalasina B, depende de flujos de Ca^{2+} (107,108). Ocurre lo mismo en células de músculo de iris de conejo estimuladas con acetilcolina (109).

Un sistema que se ajusta perfectamente al modelo de Michell es el de la glándula salivaria de mosca (110), que segrega KCl isoosmótico cuando se estimula con 5-hidroxitriptamina.

En plaquetas, la trombina estimula la hidrólisis de PI (máximo a los 10 s); hay un aumento transitorio de diglicérido seguido de la aparición de ácido fosfatídico y PI. El ionóforo A23187 es capaz de estimular la hidrólisis de PI, pero ionóforo y trombina no tienen efectos aditivos. La adición del quelante de Ca^{2+} EGTA, o de TMB-8, que inhibe la translocación intracelular de Ca^{2+} , inhibe la función secretoria y la hidrólisis de PI. (111-114).

Michell (115) señala que, aunque existen situaciones en las que la entrada de Ca^{2+} en las células puede producir la desaparición de PI, en ningún caso se ha determinado comple-

tamente la ruta de hidrólisis. Los experimentos hechos en plaquetas pueden ser criticados porque la hidrólisis del PI se debe a la acción de las fosfolipasas C y A₂; sólo la hidrólisis producida por la C es interesante cuando se considera el acoplamiento receptor-ciclo del PI. Para Michell los experimentos de Farese en páncreas (116) y Cockcroft en leucocitos de conejo no demuestran estrictamente que la hidrólisis del PI mediada por la ocupación del receptor sea dependiente de Ca²⁺. (117).

El hecho de que los distintos pasos del ciclo del PI tengan lugar en distintas localizaciones celulares ha sido otra de las razones en contra del modelo de Michell (95), pero dado que los fosfolípidos se recambian a una velocidad muy alta esta dificultad quedaría soslayada.

Los derivados mono y difosforilados del PI (DPI y TPI) unen Ca²⁺ con gran afinidad. Además de la hidrólisis de PI, en algunos sistemas se ha demostrado que DPI y TPI también se hidrolizan en respuesta a la ocupación del receptor (118). Sin embargo el efecto es dependiente de Ca²⁺ y puede ser reproducido por los ionóforos. Estudios en eritrocitos del enzima que cataliza la hidrólisis indicaban que en células sanas no se alcanzaban nunca las concentraciones de Ca²⁺ (119) necesarias. Recientemente se ha demostrado la existencia de un segundo tipo de hidrólisis muy rápida, no mediada por Ca²⁺ en hígado (120) y glándula parótida (121). Kirk y cols. (120) examinaron los efectos de la vasopresina (hormona que moviliza Ca²⁺) sobre el metabolismo del PI en hígado y encontraron que la hidrólisis de los derivados fosforilados de PI se inhibía sólo parcialmente al omitir Ca²⁺. El ionóforo A23187 no activaba la hidrólisis de DPI y TPI, por lo que sugirieron que ésta podría preceder a la de PI, siendo un paso primario en la activación del hepatocito. En la glándula parótida de rata, la unión de un agonista al receptor produce desaparición de TPI pero no afecta al DPI. Este efecto es independiente de Ca²⁺ ya que ocurre en presencia de EGTA y no puede reproducirse con ionomicina.

En algunos sistemas se ha descrito la estimulación de la síntesis de los derivados fosforilados de PI. Por ejemplo, la

ACTH inhibe la fosforilación del complejo B50 de membrana plasmática de sinaptosomas mientras que estimula la síntesis de TPI. Parece que dicho complejo es una subunidad de la DPI quinasa y su fosforilación estimulada por ACTH inhibe su actividad (122).

El conjunto de estos datos han hecho aparecer la posibilidad de que la fase inicial de la movilización del Ca^{2+} sea producida por la hidrólisis de TPI asociada a la ocupación del receptor. La desaparición de PI sería reflejo del consumo de PI en la síntesis de TPI necesaria para compensar su degradación.

La función de la producción de diacilglicerol y ácido fosfatídico tras la hidrólisis del fosfatidilinositol no está clara. El diacilglicerol puede ser origen de ácido araquidónico, del cual derivan prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, (123), o puede estar implicado en el proceso de fusión de membranas durante la respuesta secretoria. El diacilglicerol puede convertirse en ácido fosfatídico tiene propiedades ionofóricas. El diacilglicerol puede también activar a una proteína quinasa tipo C, dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos (124,125).

No está clara la secuencia de desacilación del diglicérido para producir ácido araquidónico. Mientras Bell y cols. (126) propone que tiene lugar (en plaquetas) la desacilación directa, sin acumulación de monoglicérido. Chou y Tai (127) han propuesto que la diglicérido lipasa cataliza exclusivamente la desacilación en posición 1, y utiliza 2-araquidonildiglicérido como sustrato preferente. Los requerimientos que encuentran en cuanto a Ca^{2+} y glutatión reducido. Las discrepancias podrían deberse, al menos en parte, a los distintos pH utilizados en la determinación de la actividad. A favor de que la monoglicérido lipasa y la diglicérido lipasa son dos enzimas distintas está también el trabajo de Okazaki y cols. (128) en membranas fetales.

La trombina estimula la liberación de ácido araquidónico en plaquetas mediante la acción de una fosfolipasa A_2 y una fosfolipasa C específica de PI. Billah y cols (129) estudiaron estas dos fosfolipasas en plaquetas de caballo. La mayor parte de la fosfolipasa A_2 está asociada a membranas y la C a la fracción soluble. La fosfolipasa A_2 actúa preferentemente sobre fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilcolina. Las dos enzimas tienen distintos pH óptimos y distintos requerimientos de detergentes. La fosfolipasa C de plaquetas es inhibida por poliaminas (130) y la de vesículas seminales de cordero (131); por fosfatidilcolina, mientras que es activada por diacilglicerol, debido probablemente a una interacción con el sustrato. En cerebro de rata, la fosfolipasa C existe en una forma relativamente inactiva que se convierte en una forma más activa por proteólisis (132).

En plaquetas humanas, sustancias que elevan los niveles de cGMP inhiben la producción de diacilglicerol a partir de PI, la fosforilación de una proteína de 40000D y la liberación de serotonina (133).

Wallenga y cols sugirieron que en plaquetas el ácido araquidónico provenía principalmente de la acción de una fosfolipasa A_2 sobre la fosfatidilcolina, mientras que el PI degradado por la fosfolipasa C era fundamentalmente convertido en ácido fosfatídico (134). Bills había sugerido previamente que en plaquetas humanas estimuladas con trombina la fosfolipasa A_2 que utiliza fosfatidilcolina era específica para especies que contenían araquidónico (135). También Lapetina y cols. (136) vieron que aumentando los niveles de cAMP y utilizando quinacrina en plaquetas de caballo, el ácido fosfatídico se convertía en fosfatidilinositol y no se producía liberación de ácido araquidónico. Suponían que el araquidónico se liberaba por la acción de una fosfolipasa A_2 específica de ácido fosfatídico, que estaría inhibida por la quinacrina, pero nunca pudieron ver liberación de ácido lisofosfatídico (137). Sin embargo sí han detectado producción de lisofosfatidilinositol tras

la estimulación con trombina y con A23187. Han calculado que el LPI producido supone el 40% del PI degradado con dichos estímulos (117). Por lo tanto el PI libera araquidónico en plaquetas por la acción de los dos tipos de fosfolipasas A_2 y C.

Los neutrófilos de conejo liberan ácido araquidónico cuando son estimulados con péptidos quimiotácticos (29). Hirata y Axelrod propusieron que la ruta de transmetilación sintetizaba moléculas de fosfatidilcolina ricas en ácido araquidónico, que sería posteriormente liberado por la acción de una fosfolipasa A_2 .

Cuando los neutrófilos humanos se estimulan con zimósan revestido de complemento (138,139) también se produce liberación de ácido araquidónico. Uno de los objetivos de este trabajo ha sido determinar si PC, PI o ambos eran la fuente de este metabolito.

En los polimorfonucleares tanto el araquidónico endógeno como el exógeno puede ser metabolizado por acción de las enzimas lipooxigenasa y ciclooxigenasa. Durante la fagocitosis los polimorfonucleares sintetizan prostaglandinas (140), tromboxanos (141), leucotrienos y derivados oxidados (142,143). Los mono y dihidroxiderivados son quimiotácticos en PMN.

1.8.- METABOLISMO DEL ACIDO ARAQUIDONICO

En el esquema pueden verse los metabolitos producidos por la acción de los enzimas lipo y cicloxigenasa sobre el ácido araquidónico. (Ver la revisión 423)

a) cicloxigenasa.

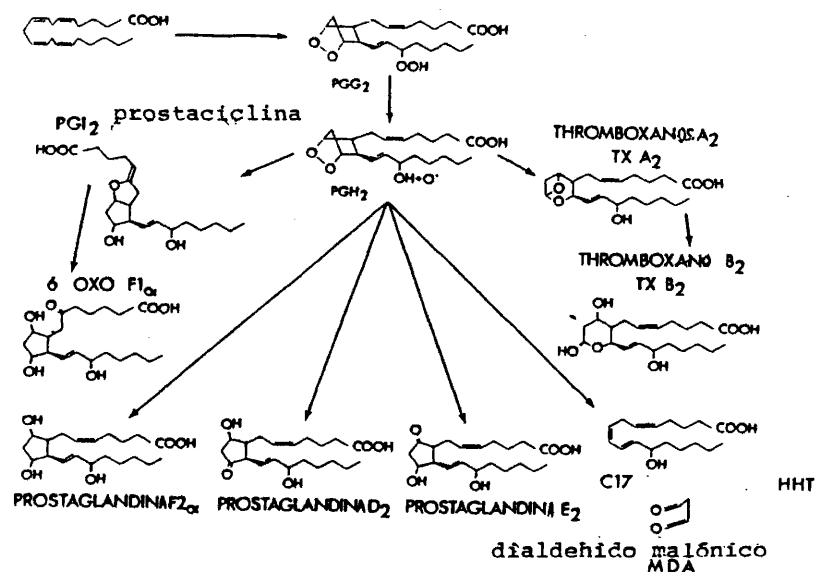
Cuando el oxígeno molecular se incorpora en un ácido graso como el araquidónico, el paso inicial es la eliminación de un átomo de H del C-13 y la peroxidación en el C-11 seguido por la adición de oxígeno en el C-15 y el cierre del anillo entre C-8 y C-12 para formar el ciclo inestable de los endoperóxidos prostaglandina G_2 y H_2 . Esta es la reacción catalizada por la cicloxigenasa. Si no ocurre el cierre del ciclo, se forma el ácido 11-hidroxi-eicosatetraenoico (11-HETE) por medio del correspondiente hidroxiperoxiácido. Alternativamente, la eliminación del H del C-13 del ácido araquidónico, facilita la peroxidación en C-15, resultando 15-HETE. Una isomerasa transforma PGG_2 o PGH_2 a las prostaglandinas estables de las series E o D y las de tipo F se forman por hidrólisis reductora. Los endoperóxidos cíclicos también pueden producir un hidroxácido de 17 átomos de C (HHT) con liberación de malondialdehído. PGG_2 y PGH_2 pueden convertirse a otro tipo de estructura: el tromboxano A_2 , que es el principal componente de la sustancia contráctil de la aorta de conejo. El $TB A_2$ es un potente vasoconstrictor y agregante de plaquetas. Se degrada químicamente a tromboxano B_2 ($TM B_2$) y la prostaciclina a 6-oxo- $PG F_{1\alpha}$, ambos estables y relativamente inactivos. En muchos tejidos las PG estables E, F y D son productos minoritarios de la oxigenación de ácidos grasos, aunque $PG E_2$ es el metabolito predominante de la acción de la cicloxigenasa detectado en los exudados inflamatorios.

b) Lipoxigenasa

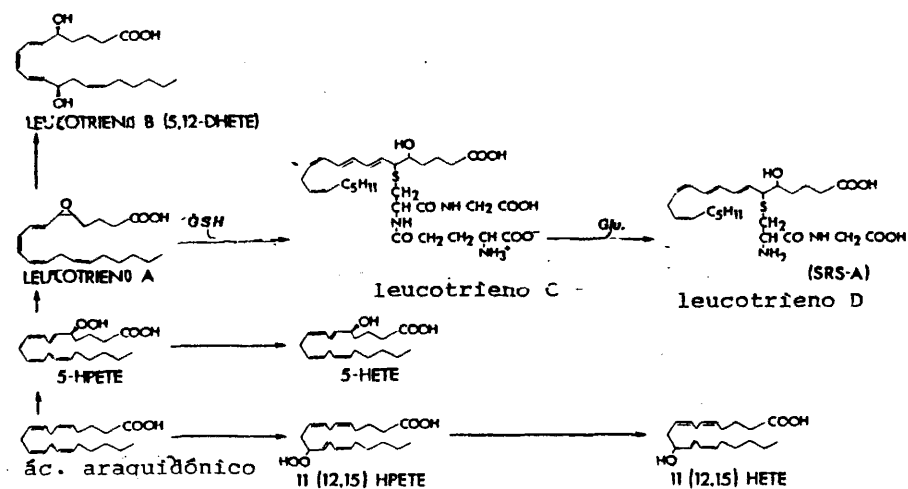
La otra ruta de oxigenación del ácido araquidónico con

CICLOXIGENASA

ácido araquidônico endoperóxidos cíclicos



LIPOXIGENASA



duce a la formación de hidroxiácidos no cíclicos. 11- y 15-hidroxi-eicosatetraenoico (HETE) pueden formarse como resultado de una reacción incompleta de la ciclooxigenasa, pero se han descubierto en plaquetas y leucocitos lipoxigenasas distintas que sintetizan 12-HETE y 5-HETE respectivamente, a partir de araquidónico. La formación de estos monohidroxiácidos está precedida por la abstracción de H y la peroxidación en la posición adecuada para dar unos intermediarios hidroperoxi inestables (HPETEs). Las plaquetas contienen una 12-HPETE peroxidasa que genera el hidroxiácido estable. Los leucocitos poseen una 12-lipoxigenasa que da lugar a una familia de compuestos que contienen una estructura de trienos conjugados y se denominan leucotrienos. El leucotrieno A es un 5,6-epóxido del araquidónico que puede hidrolizarse produciendo el 5,6-dihidroxiácido o convertirse enzimáticamente en 5,12-diHETE (leucotrieno B). Por otra parte, la adición de glutatión al epóxido produce la formación de leucotrieno C. El epóxido también puede reaccionar con otros péptidos que contengan cisteína dando lugar a una familia de lipopéptidos. El leucotrieno C tiene una actividad biológica similar a las sustancias de reacción lenta detectadas en las respuestas de hipersensibilidad inmediata. La eliminación de un resto de ácido glutámico del leucotrieno C por medio de una gamma-glutamyltranspeptidasa conduce a un cisteinilglicinil derivado (leucotrieno D) cuya estructura se atribuye a la sustancia de reacción lenta liberada en la anafilaxis.

Los productos de la lipoxigenasa son quimiotácticos para los neutrófilos (15, 144), e inducen la ~~de~~granulación de los gránulos específicos. El leucotrieno B es el responsable de la actividad quimiocinética de los leucocitos incubados con A23187 (145). Es por lo menos cien veces más activo que los monohidroxiácidos como agente quimiotáctico o quimiocinético en rata, conejo y leucocitos humanos (146). Los metabolitos del ácido araquidónico están implicados además de en los procesos de agregación y ~~de~~granulación (147-150) y quimio-

taxis, en los cambios de permeabilidad de la membrana plasmática al calcio (151), la estimulación de la ruta de las hexosasmonofosfato en la oxidación de la glucosa y la regulación de la producción de superóxido (152). Sin embargo el papel concreto del metabolismo del araquidónico en la función del neutrófilo no se conoce. Se sabe que los neutrófilos incorporan rápidamente 5-HETE y 12-HETE en sus fosfolípidos y triacilgliceroles cuando los hidroxiácidos son suministrados (153). Se ha sugerido que la reesterificación de estos hidroxiácidos en los lípidos de las membranas puede ser un mecanismo de control de funciones tales como la desgranulación y la quimiotaxis.

1.9.- FACTOR AGREGANTE DE PLAQUETAS (PAF).

Las reacciones inflamatorias agudas son moduladas por una gran variedad de moléculas, que van desde estructuras sencilla como histamina, serotonina, etc. hasta las relativamente complejas derivadas de los sistemas de coagulación y del complemento. Dentro de las de carácter lipídico hemos estudiado en el apartado anterior las derivadas del ácido araquidónico por las rutas de la ciclo y la lipoxigenasas. Pero existe un mediador de carácter lipídico, el PAF, que se produce por una ruta independiente del araquidónico.

Benveniste y cols. (154) caracterizaron su liberación a partir de basófilos de conejos sensibilizados. La anafilaxia sistémica inducida por Ig E se caracteriza por aguda trombocitopenia, neutropenia y liberación de PAF y PF4. La liberación de PAF precede a la agregación de plaquetas y secreción de serotonina y otros productos liberados por las mismas.

La estructura del PAF ha sido determinada por Demopoulos y cols. (155): 1-O-alkil-2-acetil - 3-sn-glicerilfosfolina. La abreviatura utilizada para esta estructura es AGEPC. La inyección intravenosa de AGEPC en conejos produce trombocitopenia aguda pero reversible, disminución de neutrófilos y liberación de PF4 (0.32-1.27 µg). A los 30 s de la inyección tiene lugar la máxima disminución de plaquetas y neutrófilos circulantes: la liberación máxima de PF4 ocurre a los 60 s. Si la dosis de AGEPC es de 1.5 µg se produce la muerte del conejo en menos de 2 min. Previamente disminuyen los neutrófilos, basófilos y plaquetas circulantes. Las plaquetas circulantes son secuestradas principalmente en el pulmón. (156).

EL PAF aislado de basófilos de conejo, y leucocitos de distintas especies tiene las mismas propiedades químicas y el mismo comportamiento cromatográfico.

El A23187 estimula la liberación de PAF en macrófagos, de conejo, ratas y humanos, así como de leucocitos humanos

AGEPC estimula la captación de calcio en polimorfonuclea

res (158). Aunque el AGEPC posee una acción ionoforética, el mecanismo por el cual el AGEPC estimula el movimiento de calcio a través de la membrana no se conoce. En membranas artificiales el AGEPC no influye en el movimiento de calcio (159).

La relación del PAF con el metabolismo de las prostaglandinas no está clara. Estudios con inhibidores de la síntesis de prostaglandinas indican que los efectos del factor activante de plaquetas son independientes del metabolismo del ácido araquidónico⁽¹⁶⁰⁾ en sistemas como basófilos, macrófagos y plaquetas, mientras que la liberación de araquidónico y la síntesis de tromboxanos son estimulados por AGEPC (161). La PG I₂ puede inhibir la agregación de plaquetas y la liberación de serotonina inducida por AGEPC en plaquetas de conejo⁽¹⁶²⁾. La ruta de la lipoxigenasa en polimorfonucleares está estimulada por el AGEPC (163). La adición de AGEPC a neutrófilos de conejo tratados con citocalasina B aumenta rápidamente la liberación de araquidónico tanto a partir de PI como de PC; Chilton y cols. encontraron que también se producían derivados mono y dihidroxilados, pero no encontraron producción significativa de diglicérido ni de tromboxanos. También produjo desgranulación; se liberaron lisozima y betaglucuronidasa. Todas las respuestas fueron bloqueadas con ácidos eicosatetraenoico y norhidroguaiarético.

Los macrófagos de rata y conejo liberan factor activante de plaquetas tras la fagocitosis de zimosán, pero no los macrófagos alveolares humanos (164). En neutrófilos de conejo existe liberación de PAF dependiente de calcio durante la fagocitosis de zimosán (165). La liberación de PAF también acompaña a la agregación de polimorfonucleares humanos y de conejo inducida por proteínas caiónicas, C5 a, péptidos quimiotácticos e inmunocomplejos (166-167).

El AGEPC es, por lo tanto, un estimulador potente de las respuestas de los polimorfonucleares: exocitosis, migración, producción de superóxido y agregación.

2.- OBJETIVOS.

Los leucocitos polimorfonucleares humanos son células de gran importancia en el desarrollo de las reacciones inflamatorias y por lo tanto juegan un papel importante en la defensa del organismo frente a agentes exógenos. Su acción se pone en marcha en respuesta a una variedad de estímulos que actúan sobre la membrana plasmática.

La adición de zimosán revestido de complemento desencadena una compleja cadena de reacciones que incluye la ingestión de partículas, producción de metabolitos del oxígeno tóxicos, del factor agregante de plaquetas, de metabolitos del ácido araquidónico, así como cambios en el metabolismo de fosfolípidos.

Durante los últimos años, se han descrito numerosos ejemplos en los que la adición de un estímulo que actúa sobre la superficie celular a una célula diana regula la síntesis de fosfatidilcolina por transmetilación. Estos ejemplos incluyen la adición de beta-adrenérgicos, Ig E, mitógenos, moléculas con actividad quimiotáctica, glucagón, vasopresina y otras (62, 71-91).

Nuestros objetivos son:

1) Conocer el efecto que tiene el zimosán sobre el metabolismo de fosfolípidos:

- ¿ qué efecto tiene el zimosán sobre la síntesis de fosfatidilcolina? En el caso de la adición de zimosán ¿la ruta de transmetilación funciona también como transductora de señales que actúan a nivel de membranas?
- ¿ qué efecto tiene el zimosán sobre la síntesis de fosfatidietanolamina?
- ¿ cuál es el efecto del zimosán sobre el fosfatidilinositol, cuyo recambio está aumentado durante la fagocitosis(97)?

2.- Dado que gran número de señales que actúan sobre la superficie celular activan el metabolismo del fosfatidilinositol y provocan la liberación de ácido araquidónico, se pretende conocer si la producción de ácido araquidónico estimulada por zimosa se debe a la hidrólisis de la fosfatidilcolina o a la del fosfatidilinositol.

3.- Para conocer más datos sobre la participación del metabolismo de fosfatidilcolina y fosfatidilinositol en la reacción inflamatoria, vamos a estudiar el efecto de inhibidores de la síntesis de fosfatidilcolina, del ciclo del fosfatidilinositol y de otros procesos relacionados con la internalización de receptores.

3.- MATERIAL Y METODOS.

3.1. MATERIALES

S-adenosil-(³H-metil)-L-metionina (15Ci/mmol), (³H-metil)-L-metionina (15 Ci/mmol), (³H)-5-hidroxitriptamina 16.6 Ci/mmol), (Me-¹⁴C)-colina 59.8 Ci/mmol, (Me-³H)-colina (60 Ci/mmol), L-3-³H-serina (28 Ci/mmol), CDP-(Me-¹⁴C)-colina (58 Ci/mmol), ácido (5,6,8,9,11,12,14,15-³H)araquidónico (120 Ci/mmol) y ácido (1-¹⁴C)-oleico (61 Ci/mmol), de Amersham.

S-adenosil-L-metionina, ácido adenílico cíclico, ácido guanílico cíclico, 8-bromo- ácido adenílico cíclico, fosfolipasa A₂, de Boehringer Sohn Ingelmain.

Albúmina de suero bovino, Citidín-difosfocolina, indometacina, metilisobutilxantina, ácido fenolftaleín-glucurónico, zimosán A, patrones de fosfolípidos, de Sigma.

Las placas de Silicagel 60, triton X-100, de Merck 3-deazaadenosina, homocisteína tiolactona, dansilcaverina, rimantadina, amantadina, así como los péptidos quimiotácticos fueron donados por el Dr. Schiffmann, NIH Bethesda, USA, y el 1-O-alkil-2-acetil-3-sn-glicerilfosforilcolina (factor activante de plaquetas), fue suministrado por el Dr. Benveniste, Inserm, Clarmat, Francia.

3.2.- MÉTODOS

3.2.1.- AISLAMIENTO DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES.

Los leucocitos polimorfonucleares humanos fueron aislados de sangre venosa de donantes sanos, según el método descrito en (7), usando tubos de polipropileno y 5 mM EDTA pH 7.2 como anticoagulante.

La sangre se diluye a la mitad con salino, y una vez diluida se coloca cuidadosamente sobre tubos de poliestireno de 30 ml, que contienen 10 ml de limphoprep (Ficoll Hypaque, densidad 1.077) Se centrifuga a 1500 rpm durante 20 minutos. La parte superior del centrifugado, que contiene un anillo de células mononucleadas, suero diluido y limphoprep se desecha, y la parte inferior se resuspende en gelatina 2.5% en salino pH 7.4 en proporción 2:1 v/v (gelatina/volumen sanguíneo). Se mezcla bien y se deja reposar 20 min para que precipiten los hematíes. La fase superior se recoge y se centrifuga a 2500 rpm durante 20 min. Sobre el precipitado, que contiene neutrófilos y hematíes, se efectúa un choque hipoosmótico para eliminar los hematíes restantes. El precipitado se resuspende en 1ml de tampón HEPES 6mM pH 7.4 que contiene 136.8mM NaCl, 2.61 mM KCl, 0.1% glucosa y 0.25% seroalbúmina de bovino. Sobre él se añaden 9 ml de agua destilada, y a los 35 s, 3 ml de NaCl 3.5%, y tampón previamente descrito. Se centrifuga 10 min a 1000 rpm, repitiendo el lavado.

La incubación de las células se realiza en un tampón HEPES pH 7.4, que además de los componentes anteriores, contiene 1.3 mM CaCl_2 y 1mM MgCl_2 . La densidad de las células es 10^7 células /ml.

El conteo de las células se realiza fijándolas previamente con colorante de toluidina. La riqueza final de la población es del 97 % de leucocitos polimorfonucleares de los cuales el 98% son viables (excluyen azul de tripano). La contaminación de plaquetas es menor del 0.1%.

3.2.2.- OPSONIZACION DEL ZIMOSAN

Las partículas de zimósán se recubren de complemento in cubándolas con suero fresco de donantes sanos, en proporción 10 mg zimósán / ml suero, durante 20 min a 37°. Luego se lavan con salino 4 veces para eliminar el material no unido.

3.2.3.- METILACION DE FOSFOLIPIDOS.

La suspensión de células de densidad 10^7 células/ml se incuba con zimósán opsonizado (0.2-5 mg/ml suspensión) según el experimento). Se toman muestras de células a distintos tiempos de estimulación, recogiénolas sobre tubos que contienen tampón frío. Se centrifugan a 800 rpm durante 10 min, a 4°C. Los sobrenadantes se utilizan para medir la actividad del enzima beta-glucuronidasa y del factor activante de plaquetas. El precipitado se utiliza para medir la actividad del enzima S-adenosil-L-metionina: fosfatidil etanolamina-N-metiltransferasa (PMT).

3.2.3.a.- Medida de la actividad de la PMT

1.7×10^7 células se resuspenden en 340 ul de HEPES 100 mM pH 7.4 que contiene 1mM $MgCl_2$ y glucosa 6%. Se homogenizan por sonicación en un aparato Branson B-12, colocado en posición 3, durante 15 s. Para medir la PMT se añaden al sonificado anterior 10 mM $MgCl_2$, 4 mM ditioneitol y 9uM (3H -metil)-S-adenosil-L-metionina, 1.5 μCi . El volumen total es 550 ul. La reacción empieza al añadir la (3H -metil)-S-adenosil-L-metionina y se para pipeteando 100 ul de muestra a 2ml de Cl_3CH /metanol/ H Cl 2N (6:3:1) para extraer los fosfolípidos. La fase clorofórmica se lava tres veces con KCl 0.5M en metanol 50%, se seca, y se cuenta.

3.2.3.b.- Metilación de fosfolípidos en células intactas

Se realiza preincubando la suspensión de células de densidad 10^7 c/ml con 60 μ Ci/ml de (3 H-metil)-L-metionina 45 mCi/mmol durante 30 min, 37°C, y estimulándolas con zimosán opsonizado al final de la preincubación. A los tiempos adecuados se toman muestras de 400 μ l, y los fosfolípidos se extraen con 10 ml de cloroformo /metanol/ HCL 2N (6:3:1). Se lava la fase orgánica como se ha descrito en el apartado anterior, se seca en corriente de nitrógeno, se disuelven en 100 μ l de cloroformo y se cuantifican y se separan por cromatografía en placa fina sobre placas de silicagel 60 en un sistema n-propanol / ácido propiónico/cloroformo/ agua (2:2:1:1) (79 , 83).

3.2.4.- Actividad agregante de plaquetas.

Se mide según se describe en (154). 100 μ l del sobrenadante obtenido según se ha descrito en el apartado anterior, se incuban con plaquetas de conejo previamente marcadas con (3 H-5-hidroxi)-triptamina (1 mCi/ml) y se cuenta la cantidad de radiactividad liberada. Se hace una curva patrón utilizando distintas concentraciones del factor activante de plaquetas (AGEPC) sintético.

3.2.5 - Actividad betaglucuronidasa.

Se mide determinando la cantidad de fenolftaleína liberada después de incubar durante 18 h a 37°C. 0.5ml de sobrenadante con ácido fenolftaleínglucurónico según se describe en (168). La actividad beta-glucuronidasa total se mide al lizar los polimorfonucleares con Triton X-100.

3.2.6.- Incorporación de (Me- 14 C)-colina, (1- 3 H)-etanolamina y (3 H)-serina en fosfolípidos.

Los leucocitos polimorfonucleares se marcaron con 2 μ Ci/ml de 14 C-colina o 10 μ Ci de (3 H)-colina durante 30 min a 37°C. La densidad de la suspensión era de 10^7 cel/ml. Se lavan tres veces y después del último lavado se resuspenden en tampón HEPES según se ha descrito en 3.2.1. Se mantienen 10 min a 37°C para incubarlas con zimosa opsonizado. Se toman muestras de 400 μ l (4×10^6 células), que se pipetea a tubos preenfriados, y se centrifugan a 400g 10 min, 4°C. Los fosfolípidos se extraen del precipitado con 2.9 ml de metanol/cloroformo/agua (10:10:9). La fase acuosa se trata tres veces con 3 ml de Cloroformo/metanol 1:1 y la fase orgánica se seca bajo corriente de N_2 . Fosfatidilcolina y lisofosfatidilcolina se cuantifican por cromatografía en capa fina en placas de silicagel 60 previamente activadas.

Los PMNs se incuban con 2 μ Ci/ml de (3 H)-etanolamina y 20 μ Ci/ml de (3 H)-serina, 30 min, 37°C. Se toman muestras de 400 μ l y se pipetea a tubos que contienen 1.5 ml de cloroformo/metanol 1:2. Se agita y se forman dos fases con 0.5 ml de cloroformo y 0.5 ml de KCl 2M EDTA 5 mM. La fase orgánica se seca y el cromatograma se desarrolla en el sistema cloroformo/metanol/ácido acético/ borato sódico 0.1M (75:45:12: 4.5) (129,169)

3.2.7.- Medida de la actividad CDP-colina: 1,2-diacilglicerol fosfocolintransferasa.

Muestras que contienen 2.7×10^7 células se centrifugan a 400g durante 10 min y el precipitado de células se resuspende en 200 μ l de tris-HCl 1M pH 8.5. Se homogeni-

zan por ultrasonidos en un sonicador Branson B-12 con mi crotip en posición 3 durante 15 s. El homogenizado se in cuba a 37 °C en un medio que contiene 500 mM tris-HCl pH 8.5, 0,5mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 100 nM CDPcolina y 0.5 µCi de CDP- (me-¹⁴C)-colina en un volumen final de 500 µl (170). Se toman muestras de 100 µl a distintos tiempos y se añaden la mezcla de extracción de fosfolípidos como en el apartado 3.2.3.

3.2.8.- Liberación de ácido araquidónico y araquidonildiglicérido.

Una vez aislados, los polimorfonucleares se lavan en un tampón HEPES como el previamente descrito, con la variación de que contiene 0.25% de albúmina delipidada. Las células se resuspenden en este tampón, a una densidad de 3×10^7 células /ml y se incuban en un tubo que contiene 0.5 µCi de (³H)-ácido araquidónico previamente desecado bajo atmósfera de N₂ (ya que la muestra está di suelta en tolueno, y podría producir daño a las células)

Los PMN se incuban a 37°C durante 30 min y se lavan tres veces con el tampón que contiene albúmina deli pidada, resuspendiéndose luego en el tampón normal para la estimulación con zimosa opsonizado (2mg/ml) a la den sidad de 10^7 c/ml.

Se pipetea muestras de 1 ml (10^6 células) a tubos que contienen 3.75 ml de cloroformo/metanol (2:1 v/v). Luego se añaden 1,25 ml de cloroformo y 1.25 ml de KCl 2M que contiene 5mM EDTA para formar dos fases (129). La fase orgánica se seca en corriente de N₂ y los fosfolípidos se cuantifican tras su separación en cromatografía en capa fina. Los lípidos neutros se separan en el sistema ligroína/ eter dietílico/ ácido acético (50:50:1) y los fosfolípidos en cloroformo/metanol/acético/borato sódico 0.1M como ya se ha descrito.

La incorporación del ácido (1-¹⁴C)- oleico se hi -

zo del mismo modo. También se añadieron 0.5 μ Ci/ml de olei
co marcado.

3.2.9.- Fagocitosis.

Se mide determinando la captación de partículas de zimósán. 10 μ l de la suspensión de células se diluyen 5 veces con solución de azul detoluidina en etanol. Se cuen
tan las células y se calcula el porcentaje de las mismas que han fagocitado tres o más partículas.

3.2.10.- Medida de incorporación de colina en CDP-colina

Los PMN (10^7 células/ml) se incuban con colina mar
cada como ya se ha descrito en el apartado 4. Se lavan tres veces y se resuspenden en dos fracciones, una control y otra para estimular con zimósán revestido de complemento. Se toman muestras de 400 μ l y se pipetea a 2 ml de metanol/agua (1: 0.8) en frío. se añaden 4.5 ml de cloroformo para formar dos fases. La fase orgánica se lava dos veces con 1 ml de cloroformo y 0.8 ml de agua. Se juntan las fases acuosas. Una fracción de las mismas se seca en corriente de N_2 , se disuelve en 80 μ l de agua y se aplican en placas de silicagel 60. El cromatograma se desarrolla en cloruro sódico 0.6%/metanol/amoníaco (50:50:5) (171).

3.2.11.- Actividad de diacilglicerol lipasa en PMNs.

Para medir este enzima sintetizamos previamente el 1-estearoil,2-(1- 14 C) araquidonil diglicérido a partir de 1-estearoil,2- (14 C) araquidonil-fosfatidilcolina de Amersham (59.3 mCi/mmol), disuelta en tolueno/etanol (1:1).

Partimos de 5 uCi. Secamos la solución tolueno/etanol y añadimos 1,5 ml de éter dietílico/etanol 98:2. Añadimos 60 μ l de fosfolipasa C de Bacillus Cereus (Boehr-

ger (60 U) 45 μ l de Cl_2Ca 0.02M e incubamos durante 2 horas a temperatura ambiente (172). Secamos en corriente de N_2 . Añadimos 5 ml de cloroformo, 5 ml de metanol y 4.5ml de agua. Agitamos. Secamos la fase inferior. Disolvemos en benceno (1ml) Secamos con N_2 , resuspendemos en 2 ml de éter de petróleo y guardamos a -20°C para evitar la isomerización a 1,3-diacilglicerol. Preparamos una disolución 1.6 mM.

La pureza del diacilglicerol obtenido se mide por cromatografía en ligrofina/éter/ácido acético (50:50:1) que separa ácidos grasos, diglicéridos y triglicéridos.

Para medir la diglicérido lipasa seguimos el método descrito por Bell y cols. (126). La mezcla de reacción contiene, en un volumen de 500 μ l 50 mM HEPES pH 7.0 100mM NaCl, 5mM CaCl_2 y 12mM glutatión reducido y 50 nmol de diacilglicerol marcado, más el sonicado de 2×10^7 células previamente estimuladas o no con zimosán opsonizado. La reacción tiene lugar a 37°C . A distintos tiempos, se pipetea alicuotas de 100 μ l a tubos que contienen 1.5 ml de heptano/cloroformo/metanol (1.25: 1.4: 1) y 0.5 ml de una solución saturada de K_2CO_3 . Se pipetea 700 μ l de la fase acuosa, y se cuentan.

4.- RESULTADOS

4.1.- Efecto del zimosán revestido de complemento sobre el enzima S-adenosil-L-metionina: fosfatidiletanplamina-N-metil-transferasa (PMT) en PMN humanos.

La adición de partículas de zimosán revestido de complemento (Zc) induce una inhibición rápida del enzima PMT que llega a ser hasta del $40 \pm 12\%$ (fig. 1).

La figura 2 muestra que la inhibición de la PMT precede y acompaña a otros fenómenos que tienen lugar durante la estimulación con zimosán: liberación del factor activante de plaquetas (1-O-alkil-2-acetil-3-sn-gliceril-fosforilcolina), liberación de enzimas de los gránulos, como beta-glucuronidasa, y la ingestión de partículas de ZC

El efecto del Zc sobre la PMT depende de la concentración (fig 3) y del tiempo (fig 1).

4.2.- Correlación entre la inhibición de la PMT y los efectos biológicos producidos por el zimosán.

La magnitud de la inhibición de la PMT producida por el Zc (zimosán revestido de complemento) se correlaciona bien con la extensión de la secreción del factor activante de plaquetas y la liberación del enzima beta-glucuronidasa producidas por el zimosán. Si se representa (fig. 4) la inhibición producida por dosis de zimosán que varían de 0.2 a 5 mg/ml y la secreción de beta-glucuronidasa se obtiene una recta con coeficiente de correlación $r = 0.91$, y si se hace lo mismo con la liberación del factor activante de plaquetas, se obtiene también una línea recta con $r = 0.96$

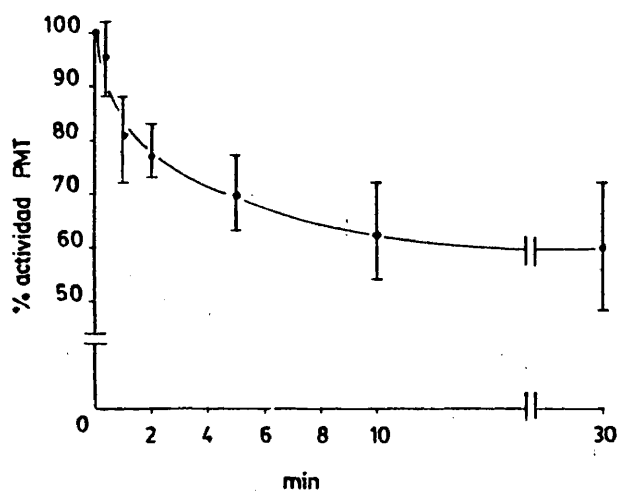


FIG 1.- Inhibición de la PMT respecto al tiempo-
A tiempo cero las células fueron estimuladas con 1mg/ml de zimosa. Se toman muestras a los tiempos indicados y la S-adenosil-L-metionina: fosfatidiletanolamina-N-metiltransferasa (PMT) se mide según se describe en Material y Métodos. Los resultados son medias \pm desviación típica de 3 experimentos.

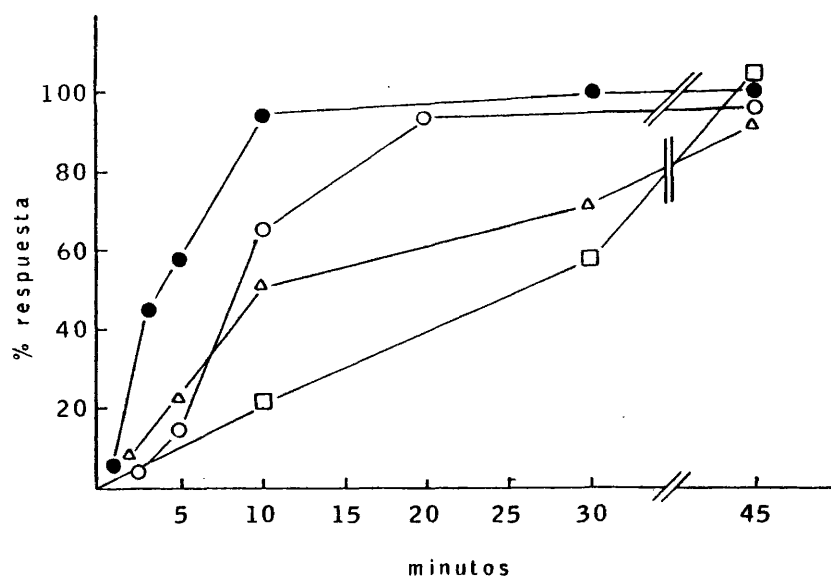


Fig. 2.- Liberación de mediadores inducida por la estimulación con zimosán.

Los resultados obtenidos a distintos tiempos están expresados como porcentajes de los valores máximos obtenidos. (□) células que han fagocitado 3 o más partículas de zimosán; (Δ) liberación de beta-glucuronidasa; (○) PAF (factor activante de plaquetas) en sobrenadantes y (●) PAF en precipitados de células. La figura representa un experimento típico.

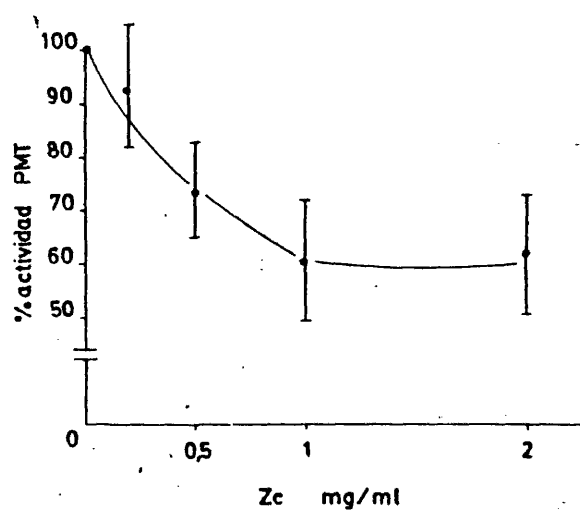


Fig. 3.- Efecto de distintas concentraciones de zimósán sobre la PMT.

Las células fueron incubadas con distintas concentraciones de Zc y la S-adenosil-L-metionina: fosfatidil-etanolamina-N-metiltransferasa se midió a los 30 min de estimulación. Los datos representan la media \pm desviación típica de tres experimentos y se expresan como % de la actividad en células no estimuladas.

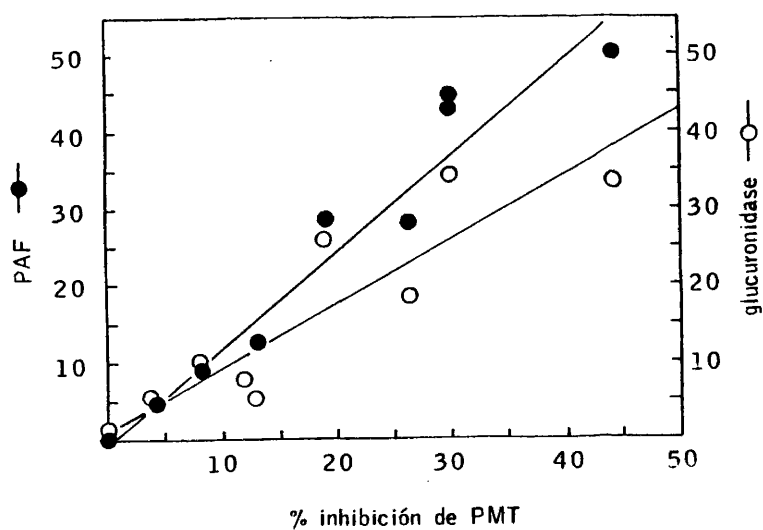


Fig. 4.- Correlación entre la inhibición de la S-adenosilmétionina: fosfatidiletanolamina-N-metil-transferasa (PMT) inducida por varias dosis de zimosán y la liberación de PAF (●) o beta-glucuronidasa (○).

Los datos son la media de 3 experimentos. PAF : factor activante de plaquetas. Las dosis de zimosán fueron 0.2-5 mg/ml.

4.3.- Cinética de la PMT.

La actividad basal en estas células es 21.5 ± 5.9 fmol /min/ 10^5 células.

La figura 5 muestra una gráfica de las inversas de las velocidades frente a las inversas de las concentraciones de S-adenosil-L-metionina (AdoMet). Dicha gráfica da unos valores de $V_{\text{máxima}} = 474$ fmol/min/ 10^6 células. y K_m aparente para AdoMet de $4.53 \mu\text{M}$.

Los datos de tres experimentos independientes se resumen en la siguiente tabla:

coeficiente correlación	K_m (μM)	$V_{\text{máx}}$ (fmol/min/ 10^6 células)
0.976	6.70	457
0.952	1.67	1412
0.970	4.53	473

Estos datos nos permiten decir que la K_m aparente de la PMT para la S-adenosil-L-metionina es del orden de 10^{-6}M y que la velocidad máxima es de 780 ± 1446 fmoles/min/ 10^6 células.

Al añadir a la mezcla de reacción 0.13 mg/ml de di-palmitoil-N,N-dimetilfosfatidilatanolamina no se observó ninguna variación en la inhibición del enzima. Esto indica que la inhibición no se debe a una disminución en la concentración de sustrato. la fosfatidilN,N,-dimetiletanolamina fue añadida en triton, de modo que la concentración final fue del 0.06% . Esta concentración de Triton inhibe un 25% la PMT. Tomando como 100% la actividad en presencia de Triton:

Adición	% actividad PMT
Triton 0.06%	100
" + PDE	133
" + Zc 1mg/ml	33.3
" + " + PDE	41.6

4.4.- Metilación en células intactas.

Cuando se preincubaban células con metionina marcada y se analiza por cromatografía en capa fina la radiactividad asociada a los fosfolípidos, se observa que la fosfatidilcolina es la que incorpora grupos (^3H)-metilo en mayor proporción. La media de los datos de 6 experimentos es, expresada en % de grupos ^3H -metilo incorporados"

fosfatidilcolina	50.3 \pm 5 % total
fosfatidil-N,N-dimetiletanolamina	25.2 \pm 3.0%
fosfatidil-N- monometilamina	29.5 \pm 2.7%

Cuando se añade 1 mg/ml de zimosán revestido de complemento, la incorporación de grupos (^3H)-metilo en fosfatidilcolina disminuye 38.9 \pm 7.8 %

La figura 6 muestra un cromatograma típico.

El efecto del zimosán en la metilación de fosfolípidos se debe a una inhibición de la síntesis.

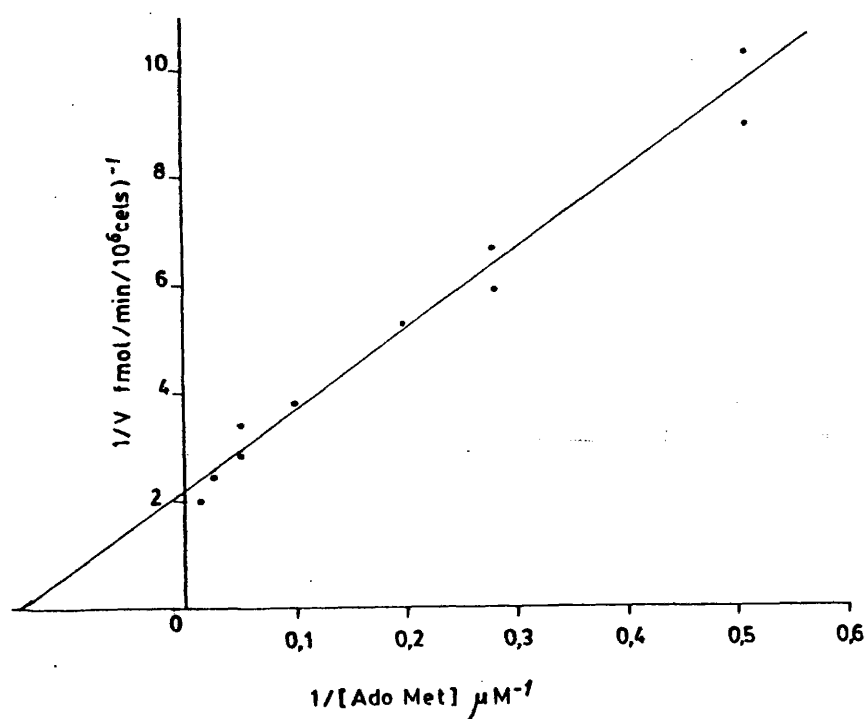


Fig 5.- Cinética del enzima S-adenosil-L-metionina: fosfatidiletanolamina -N-metil transferasa.

La gráfica representa un experimento típico. La recta obtenida tiene un coeficiente de correlación de 0.976. La K_m aparente para AdoMet es $6.7 \mu\text{M}$ y la $V_{\text{máx}}$ 457 fmol/min/ 10^6 células.

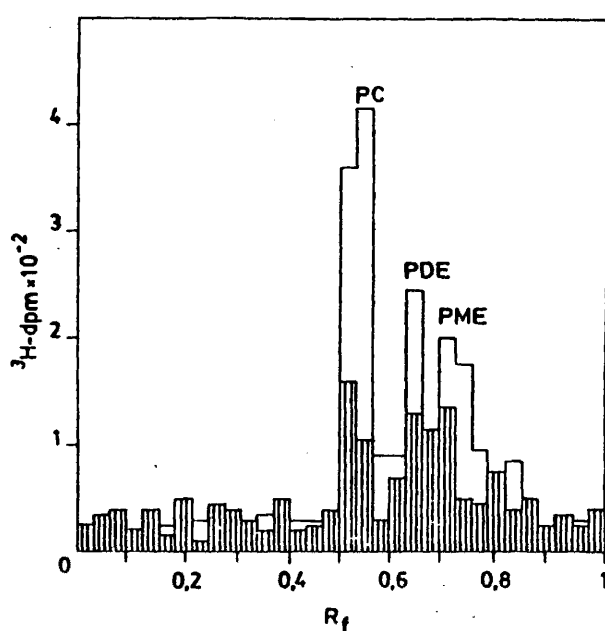


Fig. 6 .- Separación de fosfolípidos metilados en PMN marcados con (metil-3H)-metionina.

Las condiciones están descritas en Material y Métodos. Las muestras se toman a los 30 min de la adición de 1mg/ml de Zc (■) o tampón (□). La figura es el resultado de un experimento típico. PE; fosfatidiletanolamina. PME: fosfatidil-N-monometiletanolamina. PDE : fosfatidil-N,N-dimetiletanolamina. PC: fosfatidilcolina

4.5.- Incorporación de serina y etanolamina marcadas en fosfolípidos. Efecto del zimósán.

Para examinar la posibilidad de que la menor incorporación de grupos ^3H -metilo en fosfolípidos se debiera a una disminución de la cantidad de sustrato fosfatidiletanolamina, hemos estudiado también el efecto del zimósán en la síntesis de fosfatidiletanolamina en células previamente marcadas con (^3H)-etanolamina o (^3H)-serina (que se incorpora en fosfatidilserina y puede originar fosfatidiletanolamina por descarboxilación).

La fig. 7 muestra que los niveles de fosfatidiletanolamina no son afectados por la adición de zimósán. Por lo tanto la disminución de fosfolípidos metilados no se debe a un efecto del zimósán sobre el sustrato.

4.6.- Efecto de 3'-deazaadenosina y homocisteína tiolactona en la metilación de fosfolípidos.

Para examinar con mayor profundidad la relación entre la metilación de fosfolípidos y la liberación de mediadores inducida por el zimósán, hemos incubado los PMN en presencia de 3'-deazaadenosina y homocisteína tiolactona, inhibidores de las reacciones de transmetilación. Los resultados obtenidos al potenciar la inhibición de incorporación de grupos ^3H -metilo de la metionina en fosfolípidos se muestran en la tabla.

La adición de $10\ \mu\text{M}$ 3'-deazadenosina + $200\ \mu\text{M}$ homocisteína tiolactona inhibe un $20.7 \pm 5.2\%$ la incorporación de grupos ^3H -metilo en fosfolípidos. Este efecto está asociado a un aumento del $39.2 \pm 8.3\%$ de la cantidad de factor activante de plaquetas liberado en respuesta al zimósán opsonizado (1mg/ml).

Este primer resultado parecía indicar que, al potenciar la inhibición de la metilación de fosfolípidos, se potenciaba la respuesta biológica de liberación de mediadores (a menor metilación, mayor liberación), pero el

Adición	% Inhibición de grupos (³ H) -metilo incorporados	Liberación de PAF % control
10 μ M C ³ Ado + 200 μ M Hcy	20.7 \pm 5.2	139.2 \pm 8.3
100 μ M C ³ Ado + 200 μ M Hcy	51 \pm 14.4	65.2 \pm 12.9

- 64 -

C³Ado: 3-deazaadenosina
Hcy: homocisteína tiolactona
PAF: factor activante de plaquetas

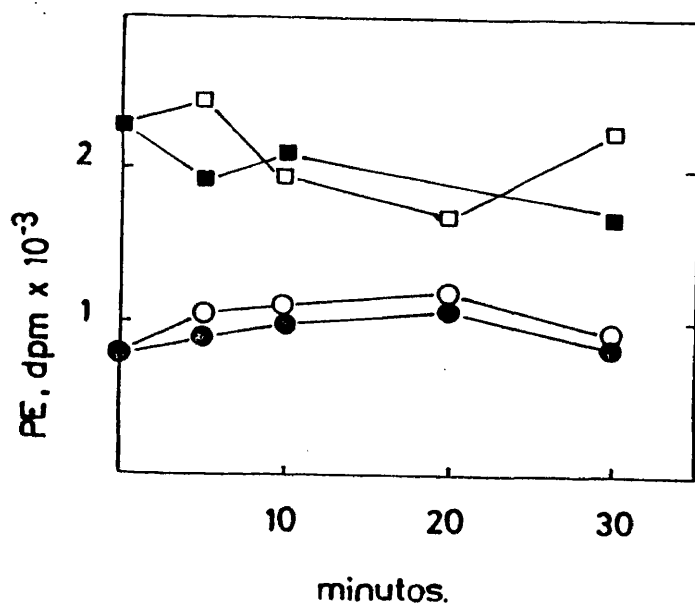


Fig 7.- Incorporación de radiactividad en fosfatidil etanolamina en células marcadas con (1-³H)-etanolamina o (3-³H)-serina . Efecto del zimosán respecto al tiempo.

A tiempo cero, las células fueron estimuladas con zimosán (2 mg/ml; 0 □) o tampón (●, ■). Las muestras se toman a los tiempos indicados y se mide la radiactividad incorporada segun se describe en material y Métodos. ○ y ● células marcadas con etanolamina; □ y ■ : células marcadas con serina. La gráfica es la media de 3 experimentos independientes.

efecto no es tan claro, ya que a una concentración mayor del inhibidor, 100 μM de $\text{C}^3\text{-Ado}$, se produce una mayor inhibición de la metilación de fosfolípidos $51 \pm 14\%$ pero la cantidad de factor activante de plaquetas que se libera, es menor: $34.8 \pm 12.9\%$

4.7.- Acción de péptidos quimiotácticos sobre la PMT.

Para obtener mayor información sobre los procesos biológicos en los que la inhibición de la metilación de fosfolípidos pudiera estar implicada, además de la fagocitosis, ensayamos la acción de péptidos quimiotácticos sobre el enzima que cataliza las reacciones de N-metilación de la fosfatidiletanolamina.

Las células fueron expuestas durante distintos tiempos a distintas concentraciones de los siguientes péptidos:

- formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) Es el péptido quimiotáctico más activo a 10^{-9}M
- formil-metionil-leucil-glutámico
- formil-metionil-leucil-fenilalanil-lisina (no quimiotáctico).

El rango de concentraciones ensayadas fue 10^{-9} - 10^{-4} y las células se estimularon durante 5, 10, 15 y 30 min. Las variaciones de la actividad PMT en células tratadas con péptidos formilados frente a células no tratadas, no fueron significativas. Fueron nulas o muy ligeras y sólo a grandes concentraciones de péptido.

Dado que algunos autores sólo son capaces de ver variaciones en algunos parámetros en presencia de citocalasina B, probamos también la acción del FMLP en presencia de dicha droga. La ligera inhibición de la actividad metiltransferasa obtenida era la misma que la de células no sometidas a citocalasina B (un 15% como máximo).

4.8.- Efecto de nucleotidos sobre la PMT.

La PMT de polimorfonucleares humanos no está modulada por nucleotidos cíclicos. Cuando se ensaya su actividad en presencia de nucleotidos, ésta permanece igual a la de homogenizados a los que no se ha añadido nada. Las actividades expresadas en % control \pm desviación típica de tres experimentos independientes son:

Adición	% actividad PMT
-	100
5'-AMP 10^{-4} M	86.25 \pm 1.25
cAMP 10^{-4} M	88.0 \pm 12
cGMP 10^{-4} M	89.6 \pm 4.5

4.9.- Estimulación de la síntesis de fosfatidilcolina por transcolinación en PMN estimulados con Zc.

4.9.a.- Incorporación de grupos metil-colina marcados en fosfatidilcolina!

Cuando se incuban PMN con colina marcada, la fosfatidilcolina exhibe 6,5 veces más radiactividad que la lisofosfatidilcolina.

La adición de zimosa a células previamente incubadas con colina- 14 C induce un aumento de la incorporación de grupos metil-colina marcados en fosfatidilcolina. Este efecto del zimosa depende del tiempo y de la dosis empleados (fig. 8 y 9)

La fig. 8 muestra el aumento de fosfatidilcolina marcada al estimular con 1 mg/ml de zimosa a distintos tiempos. El aumento es lineal durante 15 minutos y luego se alcanza una meseta. el 100% corresponde a 1665 dpm/ 10^7 c.

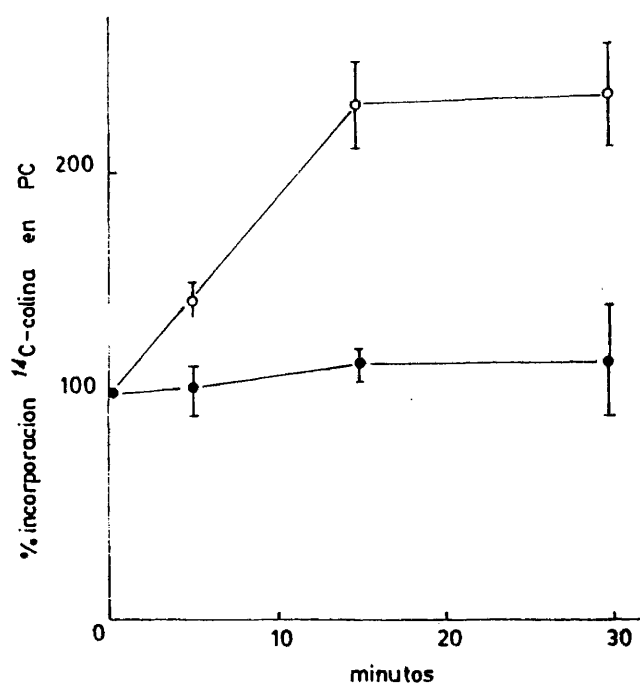


Fig. 8.- Incorporación de (^{14}C)-colina en fosfatidilcolina.

A tiempo cero se añade a las células 1 mg/ml de zimosa (o) o tampón (●). Se toman muestras a los tiempos indicados y se mide la incorporación de (^{14}C)-colina según se ha descrito en Material y Métodos. La gráfica representa la media de tres experimentos independientes.

La máxima estimulación de la incorporación de colina en fosfatidilcolina (unas 3 veces) se observa con 5 mg/ml de ZC (fig 9).

La estimulación de la síntesis de fosfatidilcolina inducida por varias concentraciones de zimosán (0.2-5 mg/ml) se correlaciona bastante bien con la de liberación del factor activante de plaquetas. En el tramo lineal el coeficiente de correlación es de 0.892.

4.9.b.- Estimulación del enzima CDP-colina: diacilglicerolfosfocolina transferasa por Zc.

La fig. 10 muestra la activación del enzima que transfiere grupos fosfocolina a moléculas de diacilglicerol cuando las células han sido incubadas durante distintos tiempos con 2mg/ml de zimosán revestido de complemento. La actividad máxima se observa a los 10 min. Luego va disminuyendo muy ligeramente. La enzima pasa de transferir 5 fmoles de grupos fosfocolina/min/10⁷ c a transferir 20 tras diez minutos de exposición a Zc.

4.10.- Cinética del enzima CDP-colina: 1,2 diacilglicerolfosfocolina transferasa.

La fig. 11 muestra un experimento típico en el que se representan las inversas de las velocidades frente a las inversas de las concentraciones de CDP-colina. El coeficiente de correlación de la recta es 0.994. Las velocidades máxima y Km aparente son 111 fmoles/min/10⁶ células y 0.333 μ M. La tabla representa los datos de 3 experimentos independientes:

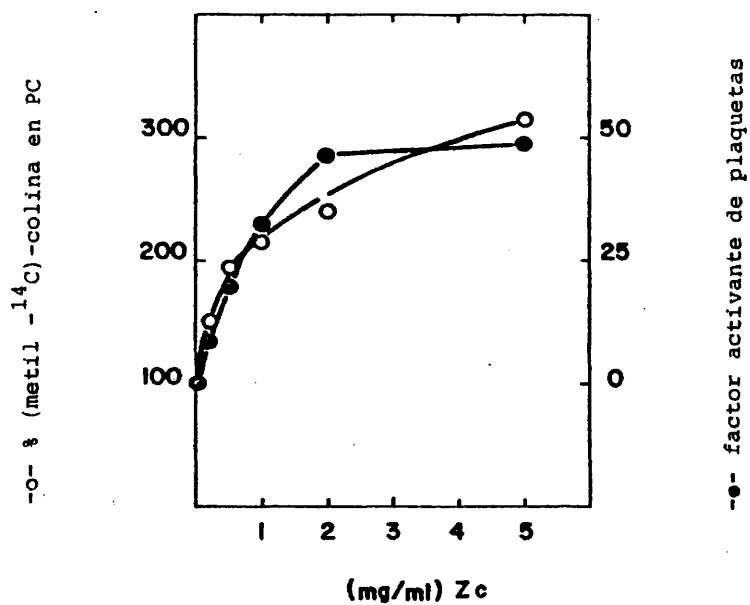


Fig. 9.- Correlación entre la incorporación de (metil-¹⁴C)-colina en fosfatidilcolina inducida por varias dosis de zimosán y la liberación del factor activante de plaquetas.

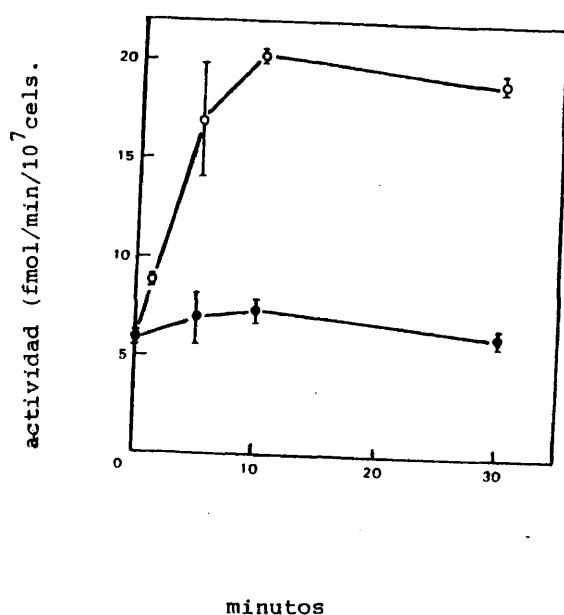


Fig. 10.- Activación de la CDP-colina: 1,2-diacilglicerolfosfocolina transferasa respecto al tiempo.

A tiempo cero las células fueron tratadas con 2 mg/ml de Zn (o) o tampón (●). La toma de las muestras y la medida de la actividad enzimática se han descrito en Material y Métodos. Los resultados expresan las medias \pm desviaciones típicas de tres experimentos independientes.

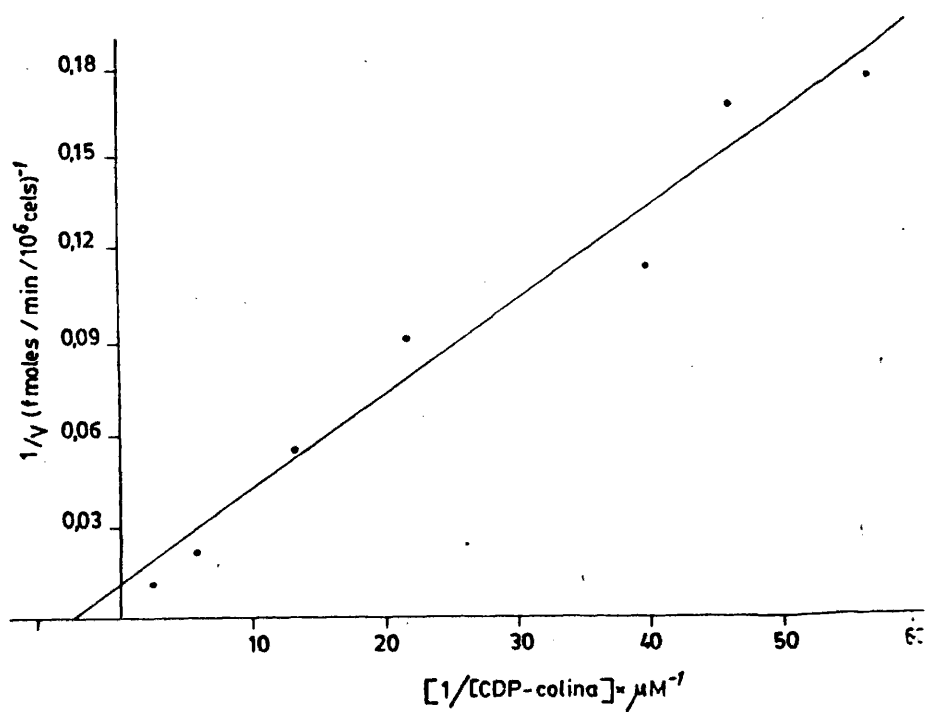


Fig. 11.- Cinética de la CDP-colina: diacilglicerol-fosfocolina transferasa.

La gráfica representa los resultados de un experimento típico. En este caso el coeficiente de correlación es $r = 0.994$. La $V_{\text{máx}}$ 111.1 y la K_m aparente para la CDP-colina $0.333 \mu\text{M}$.

r	V _{máx} fmol/min/10 ⁶ cel.	Km aparente μM
0.925	166.6	1.0
0.959	71.4	0.214
0.994	111.1	0.333

La velocidad máxima media es 116.3 +39.0 fmol/min/10⁶ cel. y la Km aparente para la CDB-colina 0.515_± μM.

Cuando los PMNs humanos son estimulados por partículas de zimosañ revestidas de complemento existe una doble regulación de la síntesis de fosfatidilcolina. Por un lado se inhibe la ruta de transmetilación y por otro se estimula la ruta de la CDP-colina.

4.11.- Efecto de 3'-deazaadenosina y homocisteína tiolactona en la incorporación de colina.

En un apartado anterior vimos el efecto de estos inhibidores de la transmetilación sobre la síntesis de PC por esta ruta y sobre la liberación del factor activante de plaquetas. Dada la coordinación de la síntesis de PC por las dos rutas, nos pareció interesante investigar el efecto que estas drogas pudieran tener en la ruta de la transcolinación.

Las células se preincubaban con drogas durante 10 min. Luego se marcan con 60 μCi/ml de (³H)-metil)metionona o 20 μCi/ml de (³H-metil)-colina; durante 30 min a 37 °C. Después se estimulan con 3,4 mg/ml de Zc, y se mide la radiactividad incorporada en fosfolípidos totales. En la fig. 12 se expresan los resultados como medias _± desviaciones típicas de cuatro experimentos, de la incorporación de colina en fosfatidilcolina en células tratadas con los inhibidores de la ruta de transmetilación.

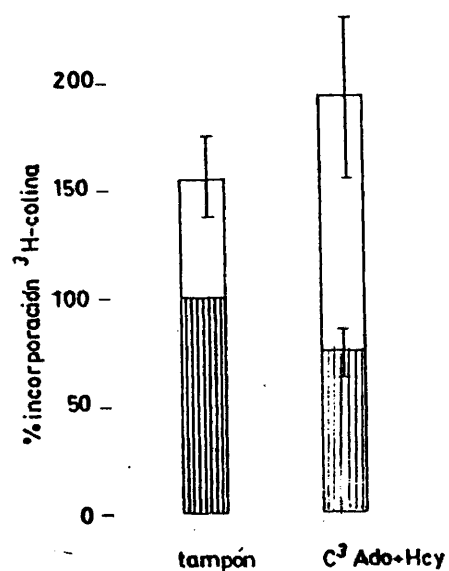


Fig. 12.- Efecto de la adición de 3'-deazaadenosina (C^3Ado) 100 μM y 200 μM homocisteína tiolactona (Hcy) en la incorporación de (^3H -metil)-colina en fosfolípidos.

Las células fueron preincubadas con las drogas durante 10 min. Luego se incubaron con ^3H -colina durante 30 min (según se ha descrito en Material y Métodos). Al cabo de ese tiempo, se estimularon (\square) o no (\blacksquare) con 3,4 mg/ml de Zc. Los resultados expresan el % respecto de controles no estimulados con drogas, de las medias de cuatro experimentos \pm desviación típica.

Adición	% incorporación grupos ³ H-metilo	% incorporación (³ H-metil) colina
-	100	100
Zc 3.4mg/ml	37.96 ± 8.29	181.7 ± 27.5
C ³ Ado 100 μM + Hcy 200 μM	53.5 ± 23.7	74.8 ± 10.5
Zc + C ³ Ado + Hcy	25.8 ± 8.37	194.6 ± 36.6

Aunque las drogas inhiben un 25.2% la incorporación de colina en fosfolípidos totales, parece que existe una potenciación de la estimulación que produce el zimosán.

Si comparamos las células marcadas con colina y tratadas con deazaadenosina y homocisteína tiolactona. la estimulación producida por el zimosán es de 2.6 veces mientras que es sólo de 1.8 veces si comparamos el efecto del zimosán en células no tratadas con drogas.

4.12.- Efecto del Zc sobre la liberación de ácido araquidónico.

Hirata y Axelrod (94) propusieron que la ruta de transmetilación proporcionaba moléculas ricas en ácido araquidónico en neutrófilos de conejo. En PMN esta ruta está inhibida y sin embargo ocurre la liberación de araquidónico.

Cuando los PMN humanos son preincubados con ácido ³H-araquidónico y se estimulan con 1mg/ml de Zc, hay un aumento de la liberación de araquidónico a lo largo del tiempo (fig. 13). A los 30 min se ha liberado 6.6 veces más araquidónico en células estimuladas que en células control. El efecto es específico para el ácido araquidónico porque si se marcan células con ácido ¹⁴C-oleico y se estimulan posteriormente con partículas de zimosán no se produce liberación de ácido oleico (fig. 13, triángulos).

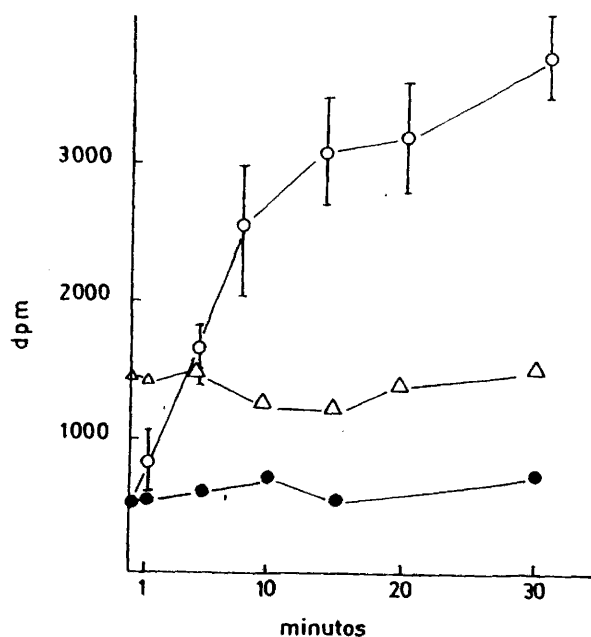


Fig. 13.- Producción de ácido araquidónico en PMNs estimulados con zimosán.

A tiempo cero las células fueron estimuladas con 1mg/ml de zimosán (o) o tampón (●). Se tomaron muestras a los tiempos indicados y la cantidad de ácido (^3H)-araquidónico se determinó como se ha descrito en Material y Métodos. (Δ) niveles de ácido ($1\text{-}^{14}\text{C}$)-oleico en células marcadas con este compuesto y estimuladas luego con 1 mg/ml de zimosán.

La gráfica es la media de 3 experimentos independientes.

4.13.- Efecto del zimósán sobre la producción de diglicérido.

Si el ácido araquidónico proviene de la hidrólisis del fosfatidilinositol por una fosfolipasa C, uno de los metabolitos que debería formarse sería el diacilglicerol. La fig. 14 muestra como células preincubadas con ácido araquidónico tritiado, la estimulación de los PMNs con 1mg/ml de zimósán aumenta los niveles de araquidonildiacilglicerol para disminuir a partir de ese tiempo.

4.14.- Origen del ácido araquidónico liberado.

La adición de 1mg/ml de zimósán durante 10 min hace que el fosfatidilinositol marcado con ácido araquidónico disminuya un 25% y la fosfatidilcolina marcada, un 14%. El araquidónico incorporado en fosfatidilinositol es 2.5 veces el incorporado en fosfatidilcolina. El 100% de la fig. 15 corresponde a 16.500 dpm para PI y 6600 para PC. Esto supone que el 80 % del ácido araquidónico generado en respuesta al zimósán se origina de fosfatidilinositol.

Tanto la fosfolipasa A₂ como la fosfolipasa C están implicadas en la liberación de ácido araquidónico durante la fagocitosis. Para conocer más datos sobre la implicación del fosfatidilinositol en la liberación de ácido araquidónico y su relación con la fagocitosis hemos analizado el efecto de compuestos que afectan al metabolismo del fosfatidilinositol con el fin de averiguar si la fagocitosis estaba también afectada. La quinacrina y la isobutilmetilxantina afectan al metabolismo de PI. La primera es un inhibidor de fosfolipasas y la segunda bloquea el recambio de PI aumentando los niveles de cAMP

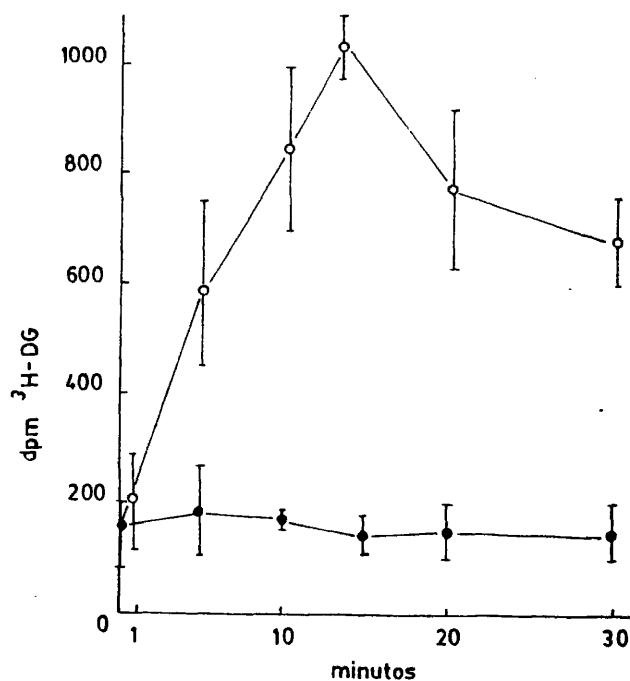


Fig. 14.- Formación de araquidonildiacilglicerol.

A tiempo cero las células fueron estimuladas con 1mg/ml de zimosán (o) o tampón (●). Se tomaron muestras a los tiempos indicados y la cantidad de (^3H)- araquidonildiacilglicerol se determinó según se ha descrito en Material y Métodos. La gráfica es la media de tres experimentos independientes.

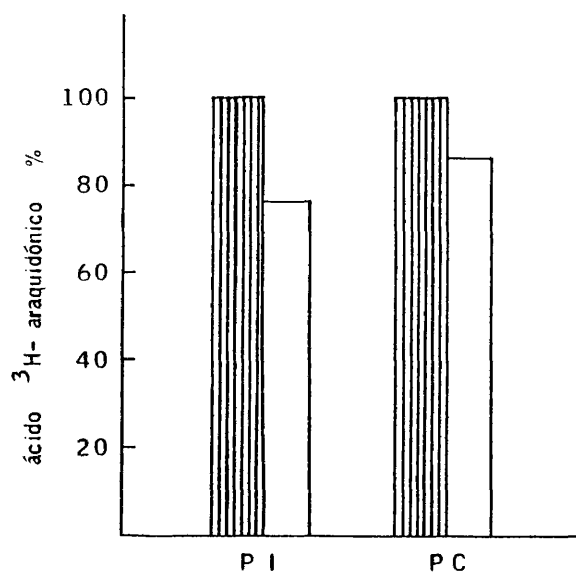


Fig. 15.- Niveles de araquidonilfosfatidilinositol y araquidonilfosfatidilcolina en PMNs estimulados con zimosán.

Las células fueron marcadas con ácido (^3H)-araquidónico y estimuladas con 1 mg/ml de zimosán durante 10 min. Los fosfolípidos fueron extraídos y separados por cromatografía en capa fina como se describe en Material y Métodos. () zimosán; () tampón' 100% corresponde a 16500 dpm para fosfatidilinositol (PI) y 6600 dpm para fosfatidilcolina (PC). La gráfica es la media de 3 experimentos independientes.

4.15.- Efecto de isobutilmetilxantina y de quinacrina sobre la liberación de ácido araquidónico.

La quinacrina 10^{-4} M inhibe un 51% la liberación de ácido araquidónico a los 15 min de estimulación con zimosán. Al mismo tiempo, inhibe un 32 % la fagocitosis de partículas (ver tabla). La isobutilmetilxantina 50 μ M, un inhibidor de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, también inhibe la respuesta fagocítica y la liberación de araquidónico. Las drogas fueron añadidas cinco minutos antes de la adición de 2 mg/ml de Zc.

Adición	%ácido araquidónico	%fagocitosis
-	23	-
Zc 2mg/ml	100	100
Zc + quinacr. 10^{-4} M	49	68
Zc + IBMX 50 μ M	66	61

Los resultados de la tabla son la media de 3 experimentos. Las desviaciones fueron menores del 15 %.

4.16.- Incorporación de colina en CDP-colina.

Durante la estimulación con 2 mg/ml de zimosán, hemos visto que la incorporación de colina en PC aumenta durante los primeros 10 min y alcanza luego una meseta. Una posible explicación de este aumento transitorio es que disminuya con el tiempo el sustrato CDP-colina. Para examinar esta posibilidad hemos medido los niveles de colina marcada incorporada en CDP-colina en células estimuladas o no con zimosán. Los resultados de la tabla indican que no hay variaciones en la colina incorporada en CDP-colina al estimular las células con Zc. La CDP-colina se consume inmediatamente para sintetizar PC.

tiempo min	% colina incorporada en control	CDP-colina Zc 2 mg/ml
0	100	100
5	107.9 \pm 4.1	109.1 \pm 1.7
10	109.6 \pm 27.6	101.1 \pm 19.8
20	97.3 \pm 26.3	84.3 \pm 13.2

El 100% corresponde a 1267.7dpm \pm 512.2 dpm

Los resultados representan la media de 4 experimentos independientes.

4.17.- Actividad diglicérido lipasa.

Hemos medido la actividad del enzima que cataliza la hidrólisis del diglicérido, necesaria para la liberación de ácido araquidónico, en PMNs humanos estimulados o no con 1 mg/ml de Zc. En la tabla se expresan los resultados de 4 experimentos independientes. El 100% corresponde a 2.63 pmoles /min /10⁶ células.

tiempo (min)	%actividad diglicérido lipasa
0	100
1	101.6 \pm 7.6
10	90.8 \pm 8.9
20	99.2 \pm 32.4

Estos resultados indican que no existen variaciones de actividad de las células estimuladas o no con Zc. Tampoco varió la actividad Diglicérido lipasa aumentando la concentración de Zc a 2 mg/ml.

4.18.- Efecto de inhibidores de transglutaminasa, serín -
esterasas y antivíricos sobre el metabolismo de
fosfatidilcolina.

La dansilcadaverina es un inhibidor de la internali-
zación de receptores. Su acción se ha atribuido a que
es capaz de inhibir la transglutaminasa. Nuestros resul-
tados indican que en PMN humanos modifica la síntesis
de fosfolípidos. Su acción es reversible y afecta más
la incorporación de colina en PC que la ruta de trans-
metilación. A concentraciones altas, como $10^{-3}M$, las
células forman agregados enormes, la acción es irre-
versible y la viabilidad de las células disminuye.

Las células son preincubadas con la droga que se
estudia durante 10 min, luego se añaden la metionina
o colina marcadas y se mide incorporación de radiac-
tividad en fosfolípidos totales.

En la tabla siguiente puede verse la reversibilidad
de la acción de la dansilcadaverina sobre la incorpora-
ción de (3H)-colina en fosfatidilcolina.

<u>Adición</u>	<u>%incorporación</u>
-	100%
DACAD $10^{-4}M$	
-células lavadas	102.6 \pm 2.3
-no lavadas	80.8 \pm 0.8
DACAD $5 \times 10^{-4}M$	
- lavadas x2	107.7 \pm 7.3
- no lavadas	64.2 \pm 0.75

La dansilcadaverina se disuelve en DMSO (dimetilsulfó-
xido). El contro. posee la misma cantidad de DMSO(1%)

4.18.a

Efecto de dansilcadaverina 500 μ M sobre la síntesis de fosfatidilcolina, fagocitosis de Zc (2 mg/ml) y liberación de factor activante de plaquetas. Los resultados de la tabla resumen los de 3 experimentos independientes y expresan la media de los % de incorporación en fosfolípidos totales \pm desviación típica.

Efecto de DACAD 500 μ M

incorporación colina	64.2 \pm 0.7%
" metionina	70.1 \pm 4.6
liberación PAF	12,0 \pm 2.1
fagocitosis	o

Otro inhibidor de transglutaminasas, el alfa-bromo 4-hidroxi-3 nitroacetofenona no afectó la vía de transmetilación, pero sí la de transcolinación. La media de 4 experimentos indica que a 100 μ M sólo incorporan el 33.4 \pm 11.6% de colina en PC las células tratadas con esta droga durante 30 min (más 10 de preincubación). A 10 μ M, la incorporación es del 84.4 \pm 17.1% del control.

Rimantadina y amantadina, utilizados como antivíricos, tampoco tienen efecto en la incorporación de grupos metilo en fosfolípidos, pero afectan la ruta de la transcolinación. Sólo tuvieron efecto a grandes concentraciones (1mM) Cuando las células se tratan con amantadina incorporan sólo el 83.6 \pm 7.38% de colina en fosfatidilcolina. Con rimantadina 1 mM, el 56.2 \pm 11.3 % de células que contienen 1% de etanol(ya que ésta es la concentración final en células incubadas con amantadina y rimantadina).

La putrescina no afectó a la síntesis de fosfatidilcolina por ninguna de las dos vías. El fluoruro de parametilsulfonilo y el fluoruro de dansilo afectan la transcolinación.

Efecto sobre la incorporación de (³H-metil)colina en fosfolípidos.

<u>Adición</u>	<u>%incorporación</u>
-	100
PMSF 10 ⁻³ M	58.1 ± 5.7
PMSF 10 ⁻⁴ M	94.9 ± 7.4
DAF 10 ⁻⁴ M	60.3 ± 6.1
DAF 10 ⁻⁵ M	97.1 ± 9.2

El fluoruro de dansilo, a concentraciones más altas (10⁻³M) produce también grandes agregados de células. La incorporación está muy inhibida, pero la viabilidad de las células es menor.

Los datos de la tabla son medias ± desviaciones típicas de 3 experimentos.

El fluoruro de dansilo afectó también a la incorporación de grupos (³H)-metilos de la metionina en los fosfolípidos. Las medias ± desviaciones típicas de 3 experimentos independientes son:

DAF 10 ⁻⁴ M	54.4 ± 18.5 %
DAF 10 ⁻⁵ M	66.3 ± 4.7 %

5.- DISCUSION.

5.1.- Síntesis de fosfatidilcolina en leucocitos polimorfonucleares humanos.

La adición de zimosán revestido de complemento a leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN) provoca una disminución en la metilación de fosfolípidos. Hemos observado que células estimuladas con 1 mg/ml fr zimosán incorporan un 38.9 ± 7.8 % grupos (^3H)-metilo que células control (al cabo de media hora). La inhibición del enzima S-adenosilmetionina: fosfatidiletanolamina-N-metiltransferasa es rápida y transitoria. Es patente a los 30 s, va disminuyendo la actividad metiltransferásica hasta los 10 min, para alcanzar una meseta a partir de ese tiempo. La inhibición del enzima depende también de la cantidad de zimosán empleado.

La disminución de fosfolípidos metilados se debe a un efecto sobre el enzima y no sobre el sustrato fosfatidiletanolamina, porque el zimosán no afecta a la incorporación de etanolamina marcada en fosfatidiletanolamina, ni la incorporación de serina en fosfatidilserina, susceptible de transformarse en fosfatidiletanolamina por descarboxilación. Cuando se añade fosfatidiletanolamina a los homogenizados de células en los que se mide la PMT, no se observan variaciones en la inhibición del enzima.

Cuando los PMNs fagocitan zimosán, se desencadena una respuesta compleja que lleva a la liberación de enzimas lisosomales, factor activante de plaquetas, y metabolitos del ácido araquidónico como hemos visto en la introducción. La inhibición de la PMT en PMNs humanos precede y acompaña a la liberación del enzima beta-glucuronidasa y del factor activante de plaquetas.

A los 5 min. la liberación de PAF (factor activante de plaquetas y de beta-glucuronidasa empieza a ser detectable, y la inhibición de la PMT ya ha alcanzado un 30% a concentraciones de zimosán que inhiben un 40% como máximo.

Además, existe una buena correlación entre la inhibición de la transmetilación y la liberación de mediadores; al añadir inhibidores de la transmetilación se modula la respuesta al zimosán. Esto sugiere que la inhibición de la metilación de fosfolípidos podría ser importante en la respuesta fisiológica.

En leucocitos polimorfonucleares humanos la adición de zimosán aumenta la incorporación de colina marcada en fosfolípidos. El efecto del zimosán es dependiente del tiempo y de la dosis. En homogenizados de células se observa una estimulación del enzima CDP-colina: diacilglicerolfosfocolina transferasa. El aumento de actividad es lineal hasta los diez minutos, y luego alcanza una meseta. El aumento de síntesis de fosfatidilcolina también es dependiente de la concentración de zimosán utilizada.

En otros sistemas también se ha descrito una disminución en la metilación de fosfolípidos: plaquetas (92), macrófagos (70) y leucocitos de conejo (25).

En el caso de los neutrófilos de conejo estimulados con péptidos quimiotácticos, la disminución de la metilación de fosfolípidos se ha atribuido a un aumento de la degradación y no a una inhibición de la síntesis. La formil-metionil-leucil-fenilalanina no afecta a la incorporación de colina. Hirata y cols. atribuyeron este aumento de la degradación a una activación de la fosfolipasa A_2 . La degradación empezaba rápidamente y alcanzaba una meseta a los 10 min.

Pike y cols. (70) vieron que la metilación de fosfolípidos se inhibía en macrófagos humanos estimulados con péptidos quimiotácticos. Observaron un 41%

de incorporación de (^3H)-metionina a los 60 min. Los macrófagos fueron estimulados con formil-metionil-metionina. Esta disminución no se debía a inhibición de la síntesis de fosfolípidos, ya que cuando incubaban las células con ^{32}P y estimulaban con distintas concentraciones de factores quimiotácticos, la incorporación de ^{32}P se mantenía igual a la de las células no estimuladas e incluso aumentaba ligeramente (15-20% en el caso de C5a).

Sin embargo, en plaquetas (92) la trombina disminuye la incorporación de grupos metilo en fosfolípidos. El efecto es muy rápido. Es detectable a los 15 segundos y continua hasta los 30 min. A este tiempo, la disminución es del 34%. Con trombina también se inhibe la incorporación de colina en fosfolípidos de plaquetas (un 33%).

Hemos visto que en PMNs humanos la síntesis de fosfatidilcolina está regulada de un modo coordinado. Al añadir zimosán, la ruta de transmetilación se inhibe hasta un 40% mientras que la de transcolinación se estimula un 200-300% (dependiendo del tiempo y la dosis considerados).

En otros sistemas también se ha descrito esta doble regulación de la síntesis de fosfatidilcolina. El ejemplo más estudiado ha sido el hígado de rata.

La síntesis hepática de fosfatidilcolina ocurre bajo control hormonal dependiente de Ca^{2+} y de cAMP. La angiotensina y la vasopresina, dos hormonas cuyos efectos en hígado están mediados por Ca^{2+} , producen estimulación de la PMT en hepatocitos (73).

En microsomas aislados de hígado de rata, Ca^{2+} en presencia de ATP también modula este enzima, así como el ionóforo A23187. (62). En hígado la PMT parece estar regulada por un mecanismo de fosforilación-defosforilación.

La angiotensina y la vasopresina inhiben la síntesis de fosfatidilcolina por transcolinación, a través de un proceso Ca^{2+} -dependiente (73). En cuanto al cAMP, el glucagón, una hormona que utiliza cAMP como segundo mensajero, estimula la síntesis por transmetilación en hepatocitos de rata (71, 72). La adición de derivados de cAMP a hepatocitos de rata inhibe la síntesis de fosfatidilcolina por transcolinación (171). La inyección intraperitoneal de colina aumenta la actividad fosfocolina transferasa y disminuye la PMT, también en hígado de rata (173).

Además, se ha estudiado la influencia de la dieta. La deficiencia de colina aumenta la actividad de la PMT e inhibe la ruta de transcolinación. La deficiencia de metionina disminuye la actividad específica de la fosfocolinatransferasa. La omisión de ambas, metionina y colina, en la alimentación de la rata durante dos semanas disminuye la actividad específica de la fosfocolina transferasa y aumenta la metiltransferasa. (174)

La ruta de la transmetilación se inhibe mediante inyección intraperitoneal de 3'-deazaadenosina a ratas (175). A pesar de ello, la cantidad de fosfolípidos totales era la misma en presencia que en ausencia del inhibidor de la transmetilación. Esto llevó a Chiang y Cantoni a proponer que en hígado existía una doble regulación. Encontraron un aumento de 30 veces en la incorporación de ^{14}C -colina a lípidos totales. La incubación de hepatocitos con deazaadenosina inhibe la transmetilación y estimula 2-3 veces la transcolinación, posiblemente activando el enzima CTP: fosfocolina citidiltransferasa (176). Sin embargo, no ocurre en la misma proporción en todos los órganos de la rata. El efecto es menor en bazo y nulo en cerebro.

La rata no ha sido el único animal para el que se ha encontrado una regulación coordinada de la síntesis de fosfatidilcolina, con inhibición de una ruta y estimulación de la otra. Por ejemplo, durante la transformación vírica de fibroblastos de hamster, la transmetilación está estimulada (87) y la transcolinación disminuye (177).

La diferenciación de células leucémicas de la línea mieloide está asociada a una disminución de la metilación de fosfolípidos y un aumento de la síntesis de fosfatidilcolina por la ruta de la CDP-colina (93).

De todos modos, la doble regulación de la síntesis de fosfatidilcolina no es un hecho generalizado. Por ejemplo, en plaquetas estimuladas con trombina, las dos rutas están inhibidas. La inhibición de la metilación es muy rápida. A los 15 s el efecto es claro y se mantiene 30 min. A los 30 min la inhibición descrita es 34% y la incorporación de colina marcada pasa de 186% a 153% del control (también a los 30 min). (92).

Los péptidos quimiotácticos inhiben la incorporación de (³H)-metionina en fosfolípidos de neutrófilos de conejo (25,70) mientras que la ruta de transcolinación permanece constante.

La actividad de la FMT más alta se ha encontrado en hígado de rata (500-1000 pmol/min/mg proteína) (61,62). La actividad de la CDP-colina: diacilglicerol fosfolipid transferasa es 1030 ± 71 pmol/min/mg proteína (178). En hígado la ruta de la transmetilación contribuye a la síntesis del 20-40% del total de fosfolípidos metilados. Su función sería mantener unos niveles estacionarios de fosfatidilcolina.

Sin embargo, en reticulocitos (79) ., eritrocitos (60) membranas de glándula mamaria (179) y en PMNs humanos la actividad es sólo 0.1-1% de la presente en microsomas de hígado de rata. En estos sistemas, la con-

tribución de la ruta de transmetilación a síntesis de fosfatidilcolina no es significativa. Se ha propuesto que en estos sistemas la función de la transmetilación sería la de actuar en la transducción de señales.

El hecho de que, en PMNs humanos, la inhibición de la metilación de fosfolípidos se correlacione con la extensión de la respuesta biológica, cuando son estimulados con zimosán, y de que la inhibición preceda y acompañe a las respuestas temporalmente, está de acuerdo con esta idea.

Además, en el caso de los PMNs humanos, la inhibición de la ruta de transmetilación y estimulación de la vía de la GMP-colina, podría reflejar el hecho de que durante la fagocitosis la célula necesita una mayor cantidad de fosfolípidos para sintetizar nuevos bloques de membrana. Por lo tanto, sería lógico encontrar una estimulación de la síntesis de fosfatidilcolina, pero no a través de la transmetilación, ya que esta ruta requiere el uso de fosfatidiletanolamina como sustrato y la fosfatidiletanolamina es otro componente mayoritario de las membranas, y su utilización debe estar inhibida. La fosfatidiletanolamina puede ser necesaria para otras funciones celulares hasta ahora desconocidas.

Para comprobar la hipótesis de la función transductora de la transmetilación de fosfolípidos se ha recurrido a estudiar qué efectos tienen los inhibidores de la transmetilación en células estimuladas. Los inhibidores utilizados han sido principalmente 3'-deazaadenosina y 5'-deoxi-5'-isobutiltio-3-deazaadenosina. (3'-deazaSIBA)

3'-deazaSIBA es un análogo de la S-adenosilhomocisteína (180) e inhibe la incorporación de timidina en linfocitos de ratón estimulados con concanavalina A (77) y la liberación de histamina en respuesta a Ig E en basófilos de conejo leucémicos (86) y mastocitos (75). Pero además de inhibir la metilación de fosfolípidos, deaza

SIBA es un potente inhibidor de la síntesis de fosfatidilcolina por la ruta de la CDP-colina en basófilos de conejos leucémicos (181) y células de neuroblastoma (182)

Estos resultados invalidan el uso de este compuesto para estudiar las funciones celulares reguladas por la metilación de fosfolípidos, debido a su falta de especificidad.

También han aparecido resultados que indican que la acción de la 3'-deazaadenosina no es específica de la transmetilación. C^3 -Ado (3'-deazaadenosina) aumenta el contenido de S-adenosilhomocisteína (AdoHcy) y 3'-deaza-adenosilhomocisteína (C^3 -AdoHcy) inhibiendo la adenosilhomocisteína hidrolasa (EC 3.3.1.1.), enzima que cataliza la hidrólisis de adenosilhomocisteína a adenosina y L-homocisteína, manteniendo baja la concentración de AdoHcy, inhibidor de todas las reacciones de transmetilación. Por ello, los dos compuestos C^3 -Ado y C^3 -SIBA son inhibidores de la transmetilación (175,183,4) C^3 -Ado inhibe la metilación de fosfolípidos y una serie de funciones celulares como la liberación de histamina medida por Ig E (86), quimiotaxis de ratón (185), quimiotaxis en neutrófilos de conejo variando la relación AdoMet/AdoHcy (186,187). Se ha descrito que aumenta los niveles de cAMP (185,188) por lo que efectos atribuidos a metilación de fosfolípidos tal vez puedan deberse al aumento de cAMP.

Por otra parte, la adenosina también inhibe la metilación de fosfolípidos en neutrófilos de conejo variando la relación S-adenosilmetionina/S-adenosilhomocisteína y no tiene efecto en la quimiotaxis (187). Si se preincubaban neutrófilos con adenosina, C^3 -Ado ya no es capaz de inhibir la quimiotaxis pero sí la metilación de fosfolípidos. Estos datos contradicen la idea de que la metilación de fosfolípidos está implicada en las primeras fases de la quimiotaxis.

Contrariamente a lo que se pensaba hasta hace poco, la metilación de fosfolípidos no es un requerimiento para la activación de plaquetas, sino más bien un resultado de esa activación⁽¹⁸⁹⁾.

Los datos se basaban en que al inhibir la transmetilación con C^3 Ado, también se potenciaba la agregación de plaquetas. Pero otra droga, 3-deazaristeromina, que produce la misma inhibición de la metilación no afecta sin embargo a la agregación ^(190, 191). La deazaadenosina no inhibe la respuesta de las plaquetas a la trombina, ADP, epinefrina, colágeno, ácido araquidónico y A23187 a altas concentraciones de agonistas y parece potenciar la respuesta a bajas concentraciones.

El efecto de la 3'-deazaadenosina sobre el cAMP no justifica totalmente el efecto sobre la agregación, ya que la inhibición farmacológica de la adenilato ciclasa por ella misma no causa o potencia la agregación de plaquetas ⁽¹⁹²⁾.

Nosotros hemos encontrado que en los polimorfonucleares humanos la inhibición de la metilación de fosfolípidos precede y acompaña a la fagocitosis de partículas de zimosa, liberación de factor activante de plaquetas y de beta-glucuronidasa. Cuando se inhibe aún más la incorporación de grupos metilo debido a la presencia de C^3 -Ado y adenosilhomocisteína, hay una mayor liberación de factor activante de plaquetas. Sin embargo, en presencia de concentraciones más altas de C^3 Ado, podría esperarse que al potenciarse aún más la inhibición de la transmetilación, la respuesta biológica medida como liberación de factor activante de plaquetas, por ejemplo, fuera aún mayor, y sin embargo no es así. Esto podría deberse o bien a que es necesaria una cierta proporción de metilación para que la respuesta fagocítica tenga lugar o bien a que la droga está actuando también a otros niveles, como elevando la concentración de cAMP. Los inhibidores de la fosfodiesterasa de cAMP bloquean la liberación de factor activante de plaquetas en respuesta al

zimosán (7). La isobutilmetilxantina 10 μ M inhibe un 38% la liberación de factor activante de plaquetas y la adición de 10 μ M de isobutilmetilxantina y 1 mM cAMP un 72%.

La metilación de fosfolípidos se ha asociado a la estimulación de la mitogénesis de linfocitos estimulada con concanavalina A (77). La concanavalina A induce un aumento transitorio y rápido de la metilación de los fosfolípidos con un máximo a los 10 s. Estos autores utilizaron deazaSIBA obteniendo inhibición de la metilación y de la mitogénesis. Sin embargo Moore y cols (78) midieron incorporación de metionina marcada en fosfolípidos a concentraciones óptimas para estimular la mitogénesis, en otros tres tipos de linfocitos, y no observaron variaciones en la metilación, pero sí en el metabolismo del fosfatidilinositol. Las diferencias no pueden atribuirse a la metodología porque Moore y cols. se ajustaron lo más posible a las condiciones utilizadas por Hirata. Estos datos se oponen a la idea de que la metilación de fosfolípidos medie la mitogénesis de linfocitos inducida por concanavalina A.

Otros procesos que transcurren con estimulación de la N-metilación de fosfolípidos son la quimiotaxis en *D. discoideum* (83), la diferenciación del cristalino en embriones de pollo (81), la secreción de ACTH en pituitaria de rata (90), la estimulación con el factor de crecimiento del nervio (89) y la estimulación con gonadotropina coriónica de células de Leydig aisladas. (81).

El puenteo de receptores de Ig E en mastocitos produce un aumento transitorio rápido (máximo a los 15 sg) de los fosfolípidos metilados (74). Lo mismo ocurre en basófilos de conejos leucémicos con un máximo a los 5 min (86).

Hirata y cols. (79) propusieron que el aumento de

la metilación de fosfolípidos producía un aumento de fluidez de la membrana en eritrocitos y reticulocitos (193) de rata. Este aumento de fluidez lo relacionaron con la activación de la adenilato ciclase (al facilitar el movimiento lateral y por consiguiente el acoplamiento de receptores) por el isoptoteranol en fantasmas de reticulocitos (79) y por la Ig E en mastocitos (75).

Este punto suscitó una gran controversia. Vance y cols. (194) adujeron que variaciones de menos de 0.00033% en la metilación de fosfolípidos no podían justificar las diferencias relativamente grandes, de 1.62 a 1.09 poise encontradas por Hirata y cols. (193)

La metilación de fosfolípidos no tiene efectos sobre la adenilato ciclase en otros sistemas, como membranas plasmáticas de hígado de rata (195, 196) o en hepatocitos estimulados con glucagón o beta-adrenérgicos. Chauhan (197) describió que ni la metilación de fosfolípidos ni la adición de fosfatidilmonometiletanolamina tienen un aumento en la fluidez de membranas de cortex de riñón.

Estos datos sugieren que la función de la transmetilación de fosfolípidos no es la de producir variaciones en la fluidez de las membranas.

Otra función atribuida a la metilación de fosfolípidos ha sido el control del número de receptores de superficie . La incubación con S-adenosilmetionina aumenta el número de receptores beta-adrenérgicos en reticulocitos de rata (199) y de receptores lactogénicos en membranas de glándula mamaria. La inhibición del enzima PMT causa una reducción del número de receptores beta-adrenérgicos en células HeLa (94).

Todos estos datos apoyan la idea de que distintos estímulos están asociados a una variación en la metilación de fosfolípidos. Pero la señal biofísica o bioquímica que está asociada a esta variación de fosfolípidos

metilados no se conoce todavía. No es la fluidez de membranas, ni la activación de la adenilato ciclasa.

Sólo en el caso del Hígado la ruta de la transmetilación está implicada en la síntesis de fosfatidilcolina, ya que esta vía puede contribuir al 20-40% del total de fosfolípidos metilados sintetizados.

Kanagi en plaquetas (199) y Crews en RBL vieron que las moléculas de fosfatidilcolina sintetizadas por transmetilación eran más ricas en ácido araquidónico. Hirata y Axelrod (94) propusieron que una función de la fosfatidilcolina sintetizada por esa ruta sería la liberación de ácido araquidónico. Sin embargo existe liberación de araquidónico tanto si la metilación de fosfolípidos está aumentada como si está disminuida.

Rehinder y Tanaka (200) solubilizaron la PMT microsomal de hígado de rata y concluyeron que había sólo un enzima. Sin embargo se ha propuesto la existencia de dos enzimas en la fracción microsomal de *N. crassa* (64), *agrobacterium tumefaciens* (201), extractos de pituitaria de rata (85), basófilos de rata leucémica (69) eritrocitos (60) médula adrenal de bovino (63). El paso de fosfatidiletanolamina a fosfatidil-N-metil etanolamina estaría catalizado por un enzima y las dos metilaciones siguientes por otro.

En eritrocitos se ha postulado la existencia de dos enzimas, con K_m aparente para AdoMet de $1.4 \times 10^{-6} M$ para el primer enzima, que sería dependiente de Mg^{2+} y se encontraría localizada en la cara interna de la membrana donde se encuentra el sustrato PE. La segunda PMT catalizaría el paso a fosfatidilcolina, no requeriría Mg^{2+} tendría pH óptimo 10.5 y K_m $10^{-4} M$. Estaría localizada en la cara externa.

En la médula adrenal de bovino (63) se han propuesto dos enzimas distintas. Las Km aparentes para AdoMet serían 1.4 μ M y 0.1 mM y pH óptimos 6.5 y 10 respectivamente. A bajas concentraciones de AdoMet el Mg^{2+} es un activador.

En la fracción microsomal de hígado de rata joven (202) se ha propuesto también la existencia de dos enzimas, Sin embargo, Scheneider y Vance en ratas adultas proponen la existencia de un sólo enzima que han purificado parcialmente, situado en la cara citoplasmática de los microsomas, con pH óptimo 9.5, sin requerimientos de Mg^{2+} para su actividad. El paso de fosfatidiletanolamina a PME es nueve veces más lento que el de ésta a PC.

Crews propuso la existencia de dos enzimas en sinaptosomas de cerebro de rata (203) con distintos pH óptimos y diferente requerimiento de Mg^{2+} .

En estos experimentos, la determinación de las Km para AdoMet se realiza a partir de la radiactividad recuperada en PME, pero parte de la PME se ha utilizado como sustrato de la supuesta PMT II. Las diferencias de actividades enzimáticas podrían deberse a un efecto de pH. A pH más bajo la actividad enzimática podría ser más baja, con lo que se produciría muy poca PME, y por consiguiente, se sintetizarían muy poca PDE y PC, con lo que la radiactividad se encontraría fundamentalmente en PME. Si a valores más altos de pH, la actividad es más alta, se sintetizaría mayor cantidad de PME, y también PDE y PC. Al pH óptimo quedaría muy poco marcaje asociado a PME porque pasaría rápidamente a formar PDE y PC. Se han obtenido cinéticas no lineales en médula adrenal de bovino, sinaptosomas y homogeneizados de D. discoideum. Este comportamiento no significa la existencia de más de un enzima, ya que puede obtenerse con un sólo enzima que muestre cooperatividad negativa.

En neutrófilos humanos al representar las inversas

de las velocidades frente a las inversas de las concentraciones de sustrato, se obtiene una recta con K_m aparente $10^{-6} M$ y una $V_{m\acute{a}x}$ 780 ± 446 fmol/min/ 10^6 células. La actividad FMT es mucho menor en neutrófilo que en hígado de rata. 10^7 células representan 1 mg proteína aproximadamente.

Prasad encontró FMT tanto en la fracción soluble como en el precipitado obtenido al centrifugar extractos de pituitaria a 2000g 20 min. En la fracción soluble estaría la PMT I y en la otra la PMT II. Sin embargo, es posible que exista una sola PMT y que la cinética y la especificidad de sustrato varíen según su localización. (85)

A favor de la existencia de dos PMT están los resultados en RBL (69). A bajas concentraciones de AdoMet, sintetizan preferentemente PME y a concentraciones altas, PC. Se han aislado variantes que transfieren bien el primer metilo, pero la segunda transferencia la hacen sólo con un 20% de eficacia respecto a la línea paterna? otras variantes, que son capaces de realizar preferentemente la transferencia de grupos metilo a PME para producir PC pero sólo tienen el 18% de la capacidad que posee la línea paterna de metilar PE. Al hibridar los 2 tipos se obtienen variantes con metilación normal

Estos resultados sugieren la presencia de más de un enzima pero no puede excluirse la posibilidad de que las diferencias en metilación de fosfolípidos se deban a otros efectos no conocidos, por que ninguna de las dos variantes son deficientes por completo en una de las actividades metiltransferásicas.

Sólo la purificación de la PMT y el estudio de la especificidad de sustrato con el enzima purificado permitirá decidir si existen realmente una o más PMT.

5.2.- Liberación de ácido araquidónico.

Ya hemos visto en la introducción la polémica existente sobre el ciclo del fosfatidilinositol. En PMNs la liberación de ácido araquidónico puede producirse por la acción de una fosfolipasa A_2 o de una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol, y la acción posterior de una diglicérido lipasa.

En PMNs humanos nosotros hemos visto que las células marcadas con araquidónico perdían un 25% de radiactividad asociada a PI y 14% de la asociada a fosfatidilcolina. Como el fosfatidilinositol incorporaba 2,5 veces más araquidónico que la fosfatidilcolina, nuestros resultados sugieren que el 80% del araquidónico liberado proviene del fosfatidilinositol.

En células estimuladas con zimosa no había variaciones en lisofosfatidilcolina, al compararlas con células no estimuladas. Esto no significa que la fosfolipasa A_2 no esté actuando sobre la fosfatidilcolina, sino que la lisofosfatidilcolina es degradada rápidamente a glicerilfosfocolina, que es soluble. Otra posibilidad es que el sistema de extracción utilizado no sea capaz de extraer los lisofosfolípidos restantes. Por estas razones hemos medido la acción de la fosfolipasa A_2 como pérdida de marcaje en fosfatidilcolina marcada con araquidónico.

Si el fosfatidilinositol se degrada mediante la acción de una fosfolipasa C deberíamos encontrar un aumento en los niveles de diacilglicerol. Al estimular con zimosa se obtiene una mayor radiactividad asociada a diacilglicerol con un máximo a los 10 min. Los niveles de diacilglicerol comienzan a disminuir luego. Este diacilglicerol puede utilizarse para activar una proteína quinasa C (independiente de nucleótidos cíclicos y dependiente de Ca^{2+} y diacilglicerol), semejante a la que existe en plaquetas, y no

encontrada todavía en polimorfonucleares humanos. Otra posibilidad es que el diacilglicerol sea fosforilado por una diacilglicerol quinasa para entrar de nuevo en el ciclo del fosfatidilinositol.

Walsh y cols. (138) no han detectado ningún aumento de diacilglicerol durante la estimulación con zimosa, y concluyeron que la enzima responsable de la liberación de ácido araquidónico era una fosfolipasa A_2 que actuaría sobre el fosfatidilinositol. Pero tampoco pudieron detectar lisofosfatidilinositol.

El hecho de que la producción de diacilglicerol sea transitoria y unas 4 veces menor que la de ácido araquidónico puede hacer que su medida presente dificultades.

Nuestros resultados están de acuerdo con la idea de que tanto la fosfolipasa A_2 como la C están implicadas en la liberación de ácido araquidónico.

El ácido araquidónico producido por la fosfolipasa C, necesita la actuación de una lipasa sobre el diglicérido para liberarse. Hemos visto que en neutrófilos humanos existe actividad diglicérido lipasa pero no es estimulada por el zimosa. La mayor cantidad de ácido araquidónico liberado se debería no a una activación de este enzima, sino simplemente a una mayor disponibilidad de sustrato.

La actividad que nosotros medimos en PMNs humanos es menor que la encontrada en plaquetas humanas y en plaquetas de caballo. Mientras que nosotros obtenemos $2,63 \text{ pmol/min}/10^6$ células Hoffmann y cols (204) obtienen $34 \text{ nmol/mg}/30 \text{ min}$, es decir unas 100 veces más y Lapetina, en plaquetas de caballo obtiene (205) $1 \text{ nmol/mg prot}/30 \text{ min}$. Nuestros datos son más parecidos a los de Lapetina. Las diferencias entre Lapetina y Hoffmann pueden deberse a la diferencia de especies o a la diferencia en los métodos utilizados.

En nuestro caso, nos hemos ajustado lo más posible al método utilizado por Hoffman. La diferencia puede deberse a que la diglicérido lipasa de plaquetas sea más activa que la de PMNs humanos.

En las plaquetas estimuladas con trombina (111) se genera diacilglicerol a los 5 s de estimulación. A los 10 s el diacilglicerol ha aumentado unas 30 veces. A partir de este momento empiezan a recuperarse los niveles basales. La radiactividad perdida por el fosfatidilinositol podía justificar la ganada por el diacilglicerol. Los triglicéridos no se marcaban y la radiactividad en ácido fosfatídico aumentaba ligeramente. Fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina no mostraban cambios de concentración; la fosfatidilcolina sí, pero sólo empezaba a perder araquidónico sólo a los 30 s y continuaba haciéndolo cuando los niveles de diacilglicerol eran los basales.

La actividad fosfolipasa C específica para el fosfatidilinositol fue encontrada por Mauco (204) y Bell (207) independientemente. El tratamiento de plaquetas con dibutíril- cAMP inhibía la producción de diacilglicerol y la liberación de serotonina. Bell (126) encontró más tarde la actividad diglicérido lipasa en plaquetas. Lyons (208) descubrió que al estimular las plaquetas con trombina tenía lugar la fosforilación de una proteína endógena de 40 y 20 KD de peso molecular. El colágeno y el PAF también producen formación de diacilglicerol y fosforilación de la proteína quinasa C y liberación de serotonina.

El papel del cGMP en el ciclo del fosfatidilinositol no está claro. Se supone que puede actuar como modulador provocando una retroinhibición.

En plaquetas, el nitroprusiato sódico y el 8-bromo - cGMP inhiben la hidrólisis del fosfatidilinositol estimulada por trombina, la formación de diacilglicerol, y la fosforilación de una proteína de 50000 D (209).

Nishizaka (210) ha descrito que esteres de forbol, que inducen la producción de tumores, se intercalan en la bicapa lipídica de la membrana y activan directamente la proteína quinasa C sin inducir el turnover de fosfatidilinositol.

En plaquetas de caballo las cosas parecen funcionar de otra manera. Lapetina y cols. (136) propusieron que el ácido araquidónico no provendría de la acción de la diglicérido lipasa, sino de una fosfolipasa A_2 específica para el ácido fosfatídico. Cuando marcaban plaquetas con fósforo y las incubaban con quinacrina para luego estimularlas con trombina, bloqueaban la liberación de ácido araquidónico, pero seguía teniendo lugar la degradación de PI a PA, para luego volver a sintetizarse PI. Billah y cols. explicaron la acción inhibitoria del cAMP (que reduce la liberación de araquidónico) mediante un aumento de la velocidad de conversión de PA a PI, disminuyendo la concentración de PA, y por tanto la liberación de ácido araquidónico al disminuir la cantidad de sustrato de la fosfolipasa A_2 específica para el ácido fosfatídico. Sin embargo, nunca pudieron confirmar su hipótesis, al no encontrar ácido lisofosfatídico (211).

Lapetina ha observado que en plaquetas de caballo el factor activante de plaquetas estimula el ciclo del fosfatidilinositol. La degradación inicial de fosfatidilinositol y la formación de ácido fosfatídico es paralela a la liberación de serotonina (212).

Lapetina y cols. (213) habían propuesto la existencia de una fosfolipasa C insensible a quinacrina (213). Sin embargo, Hofmann y cols. (204) han demostrado que la mepacrina inhibe también a la fosfolipasa C.

Imai y cols. (214) sugirieron que el recambio del fosfatidilinositol está acoplado en la agregación de plaquetas a estímulos tales como la trombina o colá-

geno, que actúan a través de receptores de membrana pero no cuando el estímulo es capaz de activar las plaquetas sin interaccionar con el receptor, como el A23187. El ionóforo no aumenta la producción de diacilglicerol y ácido fosfatídico ni fosfatidilinositol pero sí produce agregación irreversible de plaquetas y liberación de ácido araquidónico. Imai observó que se acumulaba lisofosfatidilinositol, concluyendo que con el ionóforo se activaba una fosfolipasa A_2 . También observó que el A23187 podía activar las plaquetas en ausencia de calcio extracelular.

Recientemente Billah y cols (215) han propuesto la existencia de tres procedencias distintas del fosfatidilinositol en plaquetas estimuladas (215). Dos de ellos son degradados por la fosfolipasa C específica para PI y otro por fosfolipasa A_2 . La degradación del fosfatidilinositol mediante la fosfolipasa C precede a la de la fosfolipasa A_2 . El ciclo del fosfatidilinositol sería sensible a un pequeño aumento del calcio citosólico, pero una mayor movilización del calcio bloquearía el ciclo inhibiendo la conversión del ácido fosfatídico en fosfatidilinositol y activando las fosfolipasas A_2 .

Serhan y cols (36) han descrito recientemente cambios en fosfolípidos totales analizando cantidades de fósforo en neutrófilos humanos estimulados con FMLP o PMA. Estos resultados no son comparables con los nuestros no sólo porque utilizan distintos estímulos, sino porque al utilizar sustratos marcados nosotros estudiamos recambio de fosfolípidos y los cambios pueden reflejar variaciones en compartimentos celulares o "pools" preferentemente marcados de precursores de fosfolípidos. Ellos observaron que FMLP 10^{-7} M o PMA $1 \mu\text{g/ml}$ inducen variaciones en la masa de fosfolípidos totales a tiempos muy cortos (15 s). Cinco segundos después de la adición

de FMLP el contenido de PC, PS y PA aumenta y el de PI disminuye. Entre 0-120 s solo los niveles de PA permanecen elevados mientras que disminuyen los del resto.

Cuando los neutrófilos fueron expuestos a PMA 1 µg/ml los niveles de fosfatidilcolina y fosfatidilserina aumentaron en menos de 15 s, pero no observaron variaciones en PI y PA hasta pasados 60s. El ionóforo A23187 5 µM disminuye 15% los niveles de PC y PE en 15 s. No encontraron variaciones en PI o PA.

En muchos tejidos (103) fosfatidiletanolamina y su plásmalógeno son ricos en ácido araquidónico aunque en plaquetas, sinaptosomas y macrófagos ambos incorporan ácido araquidónico muy lentamente. Por ello, comparando medidas de masa y datos de radiactividad se encuentran discrepancias. Otro problema es que la reacidilación de fosfolípidos deacidilados puede obscurecer la contribución de un fosfolípido dado. La acumulación de lisofosfolípidos refleja sólo el grado en que la reacidilación supera a la deacidilación.

En células 3T3 transformadas se ha demostrado inequívocamente la existencia de la desacidilación de PI porque está bien probada la acumulación de LPI. (216).

Otro sistema en el que la liberación de ácido araquidónico es importante ha sido estudiado por Okazaki y cols. (217). El ácido araquidónico da lugar a las prostaglandinas, que tienen un papel importante en el parto. El contenido de ácido araquidónico de PE y PI en tejido amniótico es relativamente alto antes de que empiece el parto y disminuye en las fases tempranas del mismo. El ácido araquidónico se libera de PE mediante una fosfolipasa A₂, pero también se ha demostrado la existencia de una fosfolipasa C específica de PI, deacidilglicerol

lipasa y monoglicérido lipasa en membranas fetales y en decidua vera (218). En tejido amniótico, la cantidad de diacilglicerol que es hidrolizado por la lipasa y la velocidad de liberación de ácido araquidónico podrían ser regulados por la diacilglicerol quinasa. Okazaki y cols. propusieron un mecanismo de regulación de la liberación de ácido araquidónico en tejidos intrauterinos durante el parto. A bajas concentraciones de calcio y/o diacilglicerol, el diacilglicerol sigue la ruta de la quinasa y en presencia de calcio y diacilglicerol, la ruta de la lipasa preferentemente (219).

El factor activante de plaquetas también activa el metabolismo del fosfatidilinositol en plaquetas de conejo (212). En 15 s produce una disminución de PI y el PA aumenta cuatro veces. En plaquetas previamente marcadas con fósforo aparecen marcados DPI y TPI y PA en menos de un minuto y el PI empieza a estar marcado después de un minuto.

El factor activante de plaquetas es un potente estimulador de las mismas. Diferentes tipos de células de mamíferos liberan este factor cuando son estimuladas. En plaquetas, además de producir agregación y desgranulación, produce estimulación de la liberación de ácido araquidónico con la subsiguiente síntesis de tromboxanos. Dado que el PAF y los metabolitos del ácido araquidónico estimulan a los polimorfonucleares de una manera similar, se intentó saber si el PAF mediaba el metabolismo del ácido araquidónico.

Chitton y cols. han descubierto recientemente (163) que el PAF estimula la ruta de la lipoxigenasa en polimorfonucleares de conejo.

En conclusión, cuando los neutrófilos son estimulados se produce una liberación de ácido araquidónico, que es un precursor de mediadores tan

importantes como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. El ácido araquidónico se libera de fosfatidilinositol y fosfatidilcolina. La acción de la fosfolipasa C sobre PI produce diacilglicerol transitoriamente. Este diacilglicerol puede activar a una proteína quinasa C, servir como sustrato para la síntesis de nuevo fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina por la ruta de la CDP-base, reutilizarse y entrar de nuevo en el ciclo del PI, o ser degradado con producción de araquidónico y monoglicérido, o bien ser utilizado en la síntesis de triglicéridos. No se ha investigado aún en neutrófilos el papel de DPI y TPI pero sería interesante averiguar si su metabolismo está modificado durante la estimulación con zimosán.

5. 3.- Efecto de inhibidores de endocitosis sobre el metabolismo de fosfolípidos.

Durante el proceso de fagocitosis las células unen una partícula que luego internalizan. Este proceso es paralelo a la endocitosis de receptores de ciertas sustancias tales como factor de crecimiento epidérmico, la α_2 -macroglobulina, la insulina, triiodotironina, lipoproteínas de baja densidad y algunas toxinas (220).

Inicialmente estas sustancias se unen a receptores distribuidos difusamente en la superficie celular; los complejos hormona-receptor se agrupan después en unas estructuras especializadas de la membrana, que son una especie de pozos revestidos interiormente de una proteína llamada clatrina de 180 000 D de peso molecular. Luego, los ligandos se transfieren a unas vesículas intracelulares especializadas llamadas receptosomas que llevan su contenido al aparato de Golgi (221).

En la fagocitosis de partículas de látex por macrófagos, Aggeler y cols. (222) han observado áreas de clatrina en el lado citoplasmático de los fagosomas.

Aunque en general se creía (221) que en la fagocitosis de partículas no tenían importancia las vesículas revestidas de clatrina, las observaciones de Aggeler indican que las estructuras revestidas de dicha proteína pueden tener también un papel durante la fagocitosis.

Los derivados fluorescentes del factor de crecimiento epidérmico, insulina y α_2 -macroglobulina son secuestrados en las mismas vesículas endocíticas (220).

Para estudiar el mecanismo de la internalización se han buscado inhibidores. La metilamina, dansilcaverina y otras aminas inhiben este proceso (223).

Davies y cols. (223) sugirieron que alguna etapa del proceso de internalización podía requerir la acción de la R-glutamínil péptido: amino gamma glutamyltransferasa EC 2.3.2.13 (transglutaminasa), que cataliza la formación de epsilon-(gamma-glutamínil) lisina entre moléculas de proteína y también el acoplamiento de aminos y diaminas al residuo gamma-carboxilo de la glutamina.

La transglutaminasa era la principal enzima conocida que se inhibía por varias aminos primarias y vieron que la capacidad de inhibición de la internalización se correspondía con la capacidad de inhibición de las transglutaminasas. Pero se necesitaba 5-10 veces más inhibidor para producir 50% de agrupamiento e internalización de receptores que para producir el 50% de inhibición de la transglutaminasa.

La dansilcadaverina era el inhibidor más activo, y las aminos primarias eran más efectivas que sus isómeros de cadena ramificada (224,225).

Haigler y cols. vieron que mientras que bacitracina y metilamina inhiben la transglutaminasa y la internalización de alfa₂-macroglobulina, no inhiben la internalización del factor de crecimiento epidérmico y la dansilcadaverina (DACAD) sólo lo hacía a concentraciones elevadas. Aunque los dos ligandos son secuestrados en las mismas vesículas endocíticas, el mecanismo de internalización debe ser distinto (226).

La dansilcadaverina inhibía la internalización del factor de crecimiento epidérmico (227). La amantadina, rimantadina y la dansilcadaverina inhiben la endocitosis del virus de la estomatitis vesicular (228) siendo dansilcadaverina veinte veces más potente que la rimantadina.

La rimantadina y la amantadina se han utilizado para prevenir y tratar infecciones gripales.(229).

En PMNs humanos nosotros hemos visto que la dansilcadaverina inhibe reversiblemente la síntesis de fosfatidilcolina por transmetilación y transcolinación. Otro inhibidor de la transglutaminasa, la alfa-bromo-4-hidroxí-3-nitroacetofenona, también inhibe la transcolinación, pero no influye en la ruta de la transmetilación. Los antivíricos rimantadina y amantadina no tuvieron tampoco efecto en la incorporación de grupos (^3H)-metilo de la metionina en fosfolípidos totales, pero inhibieron la síntesis de fosfatidilcolina por transcolinación, aunque se necesitaban concentraciones más altas (1mM). La rimantadina fue mas efectiva que la amantadina.

Estos datos hacen pensar que el efecto de la dansilcadaverina, rimantadina y amantadina sobre la internalización no puede atribuirse específicamente a la inhibición de la transglutaminasa, ya que otro proceso importante, como la síntesis de fosfatidilcolina, necesaria para la construcción de nuevos bloques de membrana, está también inhibido.

Pearlman y cols. (230) descubrieron que había serinesterasas implicadas en la ingestión de eritrocitos revestidos de complemento por neutrófilos de cobaya. Musson y cols. (231) usando inhibidores de esterasas, propusieron la existencia de al menos dos serinesterasas implicadas en la fagocitosis de neutrófilos humanos, una de las cuales es activada por la unión del ligando al receptor. Hemos querido ver qué efectos tienen los inhibidores de serinesterasas sobre la síntesis de fosfatidilcolina. El fluoruro de dansilo afectó a la incorporación de metionina en fosfatidilcolina y más aún la incorporación de colina. El fluoruro de parametilsulfonilo sólo afectó a esta última vía de síntesis y a concentraciones 10 veces más altas.

Inhibidores de serinesterasas bloquean en pla

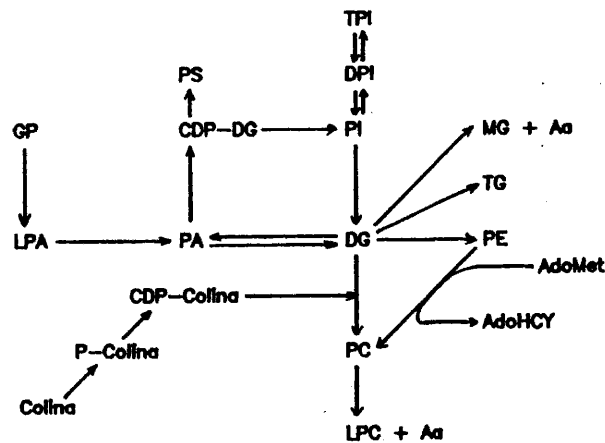
quetas la movilización del ácido araquidónico y la actividad de la fosfolipasa C específica para PI (232).

En neutrófilos de conejo, la dansilcadaverina inhibe la quimiotaxis, internalización de receptores para FMLP, pero no su unión al receptor, la síntesis de PC por transmetilación y transcolinación, así como la de PE por la vía de la CDP-etanolamina. Al mismo tiempo, aumenta la incorporación de inositol al fosfatidilinositol (233).

Recientemente se ha publicado que las poliaminas afectan a la fosfolipasa C. Esto sugiere que el efecto de la dansilcadaverina podría ser el de inhibir la degradación de PI en lugar de o además de favorecer su síntesis.

En otros tipos de células, como fibroblastos humanos, hepatocitos de rata, osteosarcoma y neuroblastomas, también se ha encontrado una inhibición de la síntesis de fosfatidilcolina por la dansilcadaverina. Es posible que la dansilcadaverina inhiba la endocitosis y la quimiotaxis perturbando marcadamente el metabolismo de los fosfolípidos (233).

El drástico efecto que tiene la inhibición de la síntesis de fosfatidilcolina con compuestos tales como la dansilcadaverina sobre la endocitosis, lleva a pensar que la regulación coordinada de la síntesis de fosfatidilcolina podría ser importante para mantener las funciones de membrana.



La figura resume el metabolismo de los fosfolípidos estudiados durante la estimulación de la fagocitosis en PMNs humanos.

Cuando la partícula de zimosán se une al receptor de membrana del PMN humano se producen una serie de cambios metabólicos que conducen a la respuesta secretoria de PAF, enzimas contenidos en los gránulos, ácido araquidónico y su metabolitos, anión superóxido, H_2O_2 y otras sustancias de acción bactericida.

Una vez que la partícula de zimosán está unida al receptor se produce la hidrólisis del PI. No se sabe todavía qué ocurre con DPI y TPI en PMNs. Esto puede conducir a una movilización del calcio intracelular, con lo que se activaría una fosfolipasa A_2 que actuaría sobre la fosfatidilcolina.

La acción de la fosfolipasa A_2 produce lisofosfatidilcolina (LPC) y un ácido graso libre, que puede ser el ácido araquidónico.

Para que se libere ácido araquidónico del PI se necesita la acción de una fosfolipasa C y una lipasa.

El diacilglicerol (DG) liberado puede ser fosforilado de nuevo produciendo ácido fosfatídico (PA) y resintetizar fosfatidilinositol (PI) o bien servir como sustrato para sintetizar PC por transcolinación (ruta estimulada cuando las células se tratan con zimosán). Este DG tal vez activa una proteína quinasa tipo C como ocurre en plaquetas estimuladas con trombina. El DG también puede utilizarse como sustrato en la síntesis de fosfatidiletanolamina (PE). La PE se transforma en PC por sucesivas transmetilaciones, pero esta ruta está inhibida cuando se estimula la fagocitosis.

El ácido araquidónico producido puede ser liberado al medio o metabolizado, produciendo mediadores de la inflamación como las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos, que influyen en las funciones del neutrófilo y en las respuestas de hipersensibilidad inmediata. Además, estos mediadores influyen en la quimiotaxis y/o en la quimiotaxis de los leucocitos. Es posible que la producción de metabolitos de la ruta de la lipoxigenasa represente un mecanismo de control para que los neutrófilos se acumulen en los centros de inflamación.

Otro mediador lipídico, el PAF, es también liberado durante la estimulación de la fagocitosis. Los estudios más recientes indican que el PAF a su vez podría influir en el metabolismo del PI, como ocurre en plaquetas, y en el del araquidónico (activando la lipoxigenasa).

El conocimiento más profundo de las complejas interrelaciones entre las rutas y el modo de influir farmacológicamente en ellas puede contribuir al diseño de drogas para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias.



6.- CONCLUSIONES.

1.- La adición de partículas de zimosán revestidas de complemento a leucocitos polimorfonucleares humanos tiene un doble efecto sobre la síntesis de fosfatidilcolina. La S-adenosil-L-metionina : fosfatidiletanolamina-N-metiltransferasa se inhibe mientras que la CDP-colina: diacilglicerolfosfolina transferasa se activa. El efecto es dependiente de la dosis y del tiempo de estimulación en ambos casos.

La inhibición de la transmetilación y la estimulación de la transcolinación se correlacionan bien con las respuestas biológicas inducidas durante la fagocitosis, tales como la liberación del enzima beta-glucuronidasa y del factor activante de plaquetas.

La función de la doble regulación de la síntesis de fosfatidilcolina en PMNs humanos sería proporcionar moléculas de fosfatidilcolina necesarias para la construcción de nuevos bloques de membrana necesarios para la fagocitosis. El gasto de fosfatidiletanolamina, sustrato de la vía de transmetilación estaría inhibido, al ser también un componente necesario de las membranas.

2- Durante la estimulación de la fagocitosis se produce una liberación de ácido araquidónico, así como un aumento transitorio de diacilglicerol, producto de la acción de la fosfolipasa C sobre el fosfatidilinositol. La liberación de ácido graso es específica del ácido araquidónico, y se produce tanto a partir de fosfatidilcolina como de fosfatidilinositol, mediante la acción de una fosfolipasa A₂ y una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol.

3.- Al modificar farmacológicamente el metabolismo de fosfatidilinositol y fosfatidilcolina, se modifica la respuesta biológica del neutrófilo humano:

- al inhibir la transmetilación, dentro de ciertas concentraciones, se aumenta la respuesta secretoria de factor activante de plaquetas
- al inhibir la liberación de ácido araquidónico con inhibidores del ciclo del fosfatidilinositol, (isobutilmetilxantina y quinacrina), se inhibe la fagocitosis
- dansilcadaverina, un inhibidor de la internalización de receptores, inhibe la síntesis de fosfatidilcolina.

REFERENCIAS

- 1.- Hirsch JG y Hirsch B en "Phagocytosis Past an Future".
Karnousky MC y Bolis L Ed (1982) Academic Press pg. 1-12
- 2.- Wright DG. (1982) en Advances in Host defense Mechanicisms
vol. I Gallin JI y Fance S Ed. Raven Press New York 76-110
- 3.- Brentwood BJ y Henson PM (1980) J.Immunol. 124, 855, 862
- 4.- Wright DG, Bralove DA y Gallin (1977) Am. J. Pathol 87,
273-281
- 5.- Naccache PH, Showell HJ Becker El Sha'aflí R (1977) J Cell
Biol 75, 635-649
- 6.- Hoffstein ST, Korchak HM, Smolen JE y Weissman. Phagocytosis.
Past and Future (1982) Academic Press pg. 47-65
- 7.- Alonso F, Sánchez Crespo M y Mato JM (1982) Immunology
45, 493-500
- 8.- Korchak HM, Eisenstat BA, smolen JE, Rutherford LE, Dunhan
BB, Weissmann G (1982) J. Biol. Chem 257, 6916-6922
- 9.- Gallin JI (1980) J. Clin. Invest. 65, 298-306
- 10.- Schiffman E (1982) Ann. Rev. Physiol 44, 553-562
- 11.- Snyderman R, Pike MC y Cianciolo G. Phagocytosis. Past and
Future (1982) Academic Press Pg. 67-86
- 12.- Seligman BE, Fletcher MP y Gallin JI J. Biol Chem (1982)
257, 6280-6286
- 13.- Schiffman E, Corcoran BA y Wahl SM (1975) Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 72, 1059-62
- 14.- Goetzl EJ. Derian CK Tauber SJ y Valone FH (1980) Biochem.
Biophys. Res. Commun. 94, 881-888

- 15.- Goetzl EJ, Pickett WC (1980) J. Immunol. 125, 1789-91
- 16.- Kelson RD, Vance DF y Chenoweth DE (1982) Am. J. Pathol. 107,2 , 202-211
- 17.- Donabedian H, Gallin JI (1981) J. Immunol 127, 839-44
- 18.- Fletcher MP, Gallin JI (1980) J. Immunol. 124, 1585-88
- 19.- Lane TA, Lamkin GE (1982) Blood 59, 1337-1343
- 20.- Maraseo WA, Becker EI, Oliver JM Am.J.Pathol. 1980, 78, 749-768
- 21.- Naccache HJ Showell H Becker EI y Sha'afi (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 1224-30
- 22.- Becker EI, Showell H, Naccache HJ, Freer R, Wallenga RW y Sha'afi RI (1982) En Phagocytosis "Past and Future" Pg. 87-103
- 23.- O'Dea RF , Viveros OH, Axelrod J, Aswanikumar S, Schiffman E, Corcoran BA (1978) Nature 272, 462-64
- 24.- Pike MC, Kredich NM, Snyderman R (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3928-32
- 25.- Hirata F, Corcoran BA, Venkatesubramanian K, Schiffman E, Axelrod J (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2640-43
- 26.- Babior BM (1978) New England J. of Medicine, 298, 721-725 y 659-668
- 27.- Babior BM (1982) en Phagocytosis Academic Press 157-166
- 28.- Klebanoff SJ (1982) en Advances in host defense mechanisms vol.1 Ed. Jhon I. Gallin Raven Press pg. 111-162
- 29.- Sbarra AJ, Karnovsky MC (1959) J. Biol.Chem. 234, 1355-1362

- 30.- Iyer GYN, Islam MF, Quastel JH (1961) Nature 192, 533-54
- 31.- Singer S y Nicholson G (1973) Science 175, 720-731
- 32.- Elsbach P en Lipid metabolism in mammals Vol. 1 pg. 259-276 Snyder F, Ed. Plenum Press 1977
- 33.- Quinn PJ (1976) The Molecular Biology of cell Membranes McMillan Press Ltd.
- 34.- Goodall RJ, Lai YF y Thomson JE (1972) J.Cell Sci. 11, 569-72
- 35.- Kamp HH, Wirtz KWA y Van Deenen LLM (1973) Biochem. Biophys. Acta. 318, 313-25
- 36.- Serhan CN., Broekman MJ., Korchak HN, Marcus AJ y Weissman G (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun 107, 951-958.
- 37.- Kennedy EG y Weiss SB (1956) J. Biol. Chem. 222, 193-214
- 38.- Kennedy EG (1962) The Harvey Lectures 57, 143-191
- 39.- Bremer J, Figard PH y Greenberg DM (1960) Biochem. Biophys Acta 43, 477-488
- 40.- Bremer J y Greenberg DM (1961) Biochem. Biophys. Acta 46, 205-216
- 41.- Erlband JF y Marinetti GV (1965) Biochem. Biophys. Acta 106, 128-138
- 42.- Porcelatti G, Arienti G, Pirotta M, Giorgoni P (1971) J. Neurochem. 18, 1395-1417
- 43.- Kennedy EP, Borkenhagen LF y Smith SW (1959) J. Biol. Chem. 234, 1998-2000
- 44.- Kanoh H y Ohno K (1981) Methods in Enzymology 71 pg. 536-546

- 45.- Morimoto y Kanoh (1978) J. Biol. Chem. 253, 5056-60
- 46.- Dils RR y Hubscher G. (1960) Biochem. Biophys. Acta 46, 505-513.
- 47.- Weinhold PA, Skinner RS y Sanders RD (1978) Biochim. Biophys Acta 326 (1973) 43-51
- 48.- Vance DE y Choy PC (1979) Trends in Biol. Sci. (1979) 4, 145-148
- 49.- Chida N, Hirono H, Nishimura Y, Arakawa T (1973) Tohoko J. Exp. Med. (1973) 110, 273-282
- 50.- Vance DE, Trip EM, Paddon HB J. Biol. Chem. 255, 1064-1069
- 51.- Pritchard PH y Vance DE (1981) Biochem. J. 196, 261-267
- 52.- Zelinski TA, Savard J, Mau RY, Choy PC (1980) J. Biol. Chem. 255, 11423-11428
- 53.- Choy PC y Vance DE (1978) J. Biol. Chem. 253, 5163-5167
- 54.- Parthasarathy S y Bauman WJ (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 637-642
- 55.- Choy PC, Scheider WJ y Vance DE (1978) Eur. J. Biochem 85, 189-193
- 56.- Feldman DA, Kovac CR, Dranginis PL y Weinhold PA (1978) J. Biol. Chem. 253, 4980-4986
- 57.- Rooney SA (1979) Trends. Biochem. Sci. 4, 189-191
- 58.- Vigo y Vance DE (1981) Biochem. J. 200, 321-326
- 59.- Moore TS (1981) Methods in enzymology 71, 596-613
- 60.- Hirata F y Axelrod JC (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2348-2352

- 61.- Schneider WH. y Vance D. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3886-3891.
- 62.- Castaño JG., Alemany S., Nieto A., y Mato JM. (1980) J. Biol.Chem. 255, 9041-9043
- 63.- Hirata F., Viveros D. y Axelrod J. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1718-1721.
- 64.- Scarborough G. y Nyc JC. (1967) J. Biol. Chem. 242, 238-242.
- 65.- Sundler R. y Akesson B. (1975) J. Biol. Chem. 250, 3359-3367.
- 66.- Hoffman R, Cornatzer WE, Duerre (1979) Can.S. Biochem. 57, 56-65
- 67.- Im YS Chiang PK y Cantoni GL (1979) J.Biol. Chem. 254, 11047-11050
- 68.- Hoffman R, Haming JA, Cornatzar WE (1981) Int. J. Biochem. 13, 795-798
- 69.- McGivney A, Crews IT, Hirata F, Axelrod J, Siragamian RP (1981) Proc.Natl.Acad. Sci. USA 78, 6176-6180
- 70.- Pike MC, Kredich NM y Snyderman R (1979) Proc. Natl.Acad. Sci. USA 76, 2922-2926
- 71.- Geelen MJH, Groener JEM, De Haas CEM, Wisserfof TA y Van Golde CMG (1979) FEBS Lett. 105, 27-30
- 72.- Mato JM, Alemany S, G^a. Gil M, Marín Cao D,

- 119 Varela I y Castaño JG (1982) en Biochemistry of
S-Adenosylmethionine and related compounds.
Usdyn E, Borchardt RT y Crevellin RC Ed. pg.
187-194
- 73.- Alemany S, Varela I y Mato JM (1981) FEBS
Letters 135, 111-114
- 74.- Ishizaka T, Hirata F, Ishizaka KJ, Axelrod
(1980) Proc.Natl.Acad. Sci. USA 77, 1903-1906
- 75.- Ishizaka T, Hirata F, Ishizaka KJ, Axelrod S
(1981) Proc.Natl. Acad.Sci. USA 78, 6812-6816
- 76.- Hirata F, Strittmatter WJ y Axelrod S Proc.
Natl.Acad.Sci. USA 76, 4813-4818 (1979)
- 77.- Hirata F, Toyoshima S, Axelrod J y Waxdal MJ
(1980) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 862-865
- 78.- Moore JP, Smith GA, Hesketh RT y Metcalfe JC
(1982) J.Biol.Chem. 257, 8183-8189
- 79.- Hirata F, Strittmatter, Axelrod J (1979) Proc.
Natl.Acad.Sci. USA 76, 368-372
- 80.- Munzel P, Koschel K (1982) Proc.Natl.Acad.Sci.
USA 79, 3692-3696
- 81.- Nieto A y Catt K (1983) J.Endocrinology (in Press)
- 82.- Saavedra JM (1980) Clinical Science 59, 2395-2425
- 83.- Alemany S, García Gil M, Mato JM (1980) Proc.Natl.
Acad.Sci. USA 77, 6966-6999
- 84.- García Gil M, Alemany S, Marín Cao D, Castaño
JG, Mato JM (1980) Biochem.Biophys.Res.
Commun. 94, 1325-1330
- 85.- Prasad C, Edwards RM (1981) J.Biol.Chem. 256,
13000-13003

- 86.- Crews FT, Morita Y, Hirata F, Axelrod J y Siraganian JR (1980) Biochem.Biophys.Res.Communications 93, 42-49
- 87.- Mazière C, Mazière JC, Mora L, Polonowski J (1981) FEBS Lett. 139, 217-220
- 88.- Limas CJ (1980) Biochim.Biophys.Acta. 632, 254-259
- 89.- Karl H, Pfenniger P y Honson P (1981) Proc. Natl. Acad.Sci. USA 78, 7797-7800
- 90.- Hook VYH, Heisler S y Axelrod J (1982) Proc. Natl.Acad.Sci. USA 79, 6620-6624
- 91.- Zelenka PS (1982) Science, 217, 1265-1266
- 92.- Shattil SJ, McDnough MM, Busch JW (1981) Blood 57, 537-544
- 93.- Honma Y, Kasuhake T, Hozumi M (1981) Biochim. Biophys. Acta 644, 441-444
- 94.- Hirata F y Axelrod J (1980) Science 209, 1082-1090
- 95.- Michell RH (1975) Biochim.Biophys.Acta 415, 81-147
- 96.- Karnovsky MC y Wallach DFH (1961) J.Biol.Chem. 236, 1895-1901
- 97.- Sastry PS y Hokin LE (1966) J.Biol.Chem 241, 3354-3361
- 98.- Tou JS, Stjernholm RC (1974) Arch. Biochem. Biophys. 160, 487-494
- 99.- Van den Bosch H (1980) Biochim.Biophys. Acta. 604, 191-246

- 100.- Victor, M., Weiss, J., Klempner, M.S., Elsbach, P.
(1981) FEBS Lett. 136, 298-300
- 101.- Flower, R.J., Blackwell, G.J. (1979) Nature 278,
456-459
- 102.-Hirata, F., Schiffman, E., Venkatasubramanian, K.,
Salomon, D., Axelrod, J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 77, 2533-2536
- 103.- Irvine, R.F. (1982) Biochem. J. 204, 3-16
- 104.- Takenawa, T., Nagai, Y. (1981) J. Biol. Chem. 256,
6769-6775
- 105.- Blaesdale, J.E., Wallis, P. B.B.A. (1981) 664, 428-
440
- 106.- Hawthorne, J.N. (1982) Nature 295, 281-282
- 107.- Cockraft, S. (1981) T.I.P.S. 2, 340,343
- 108.- Cockraft, S., Bennet, J.P., Gomperts, B.D. (1980)
Nature 288, 275-277
- 109.- Akthar, R.A., Abdel-Latif (1982) J. Neurochem. 39,5,
1374-1380
- 110.- Fain, J.N., Berridge, M.J. (1979) Biochem. J. 178,
45-58
- 111.- Rittenhouse-Simmons (1979) J. Clin. Invest. 63,
580-587

- 112.- Broekman, M., Ward, J.W., Marcus, A.J. (1980) J. Clin. Invest. 66, 275-283
- 113.- Shaw J.O. y Lyons R.W. (1982) Biochim. Biophys. Acta 714, 492-499.
- 114.- Shaw, J.O., Lyons, R.M. (1982) Biochim. Biophys. Acta 714, 500-504
- 115.- Michell, R.H. (1982) Nature 296, 492-493
- 116.- Farese, R.W., Lasson, R.G., Sabiv, M.A. (1980) B.B.A. 663, 479-485
- 117.- Cockcroft, S., Bennet, J.P., Gompers, B.D. (1981) Biochem. J. 200, 501-508
- 118.- Abdel-Latif, A.A., Akhtar, R.A., Hawthorne, J.N. (1977) Biochem. J. 162, 61-73
- 119.- Downes, C.P., Michell, R.H., (1982) Biochem. J. 202, 53-58
- 120.- Kirk, C.J. Creb, J.A., Downes, C.P., Michell, R.H. (1981) Biochem. Soc. Trans. 9, 377-379
- 121.- Weiss, S.J., McKinney, J.S., Putney, J.W. (1982) Biochem. J. 206, 555-560
- 122.- Jolles, J., Zwiers, H., Dekker, A., Wirtz, K., Gispeer, W.H. (1981) Biochem. J. 194, 283-291
- 123.- Higgs, G.A. (1982) en Phagocytosis. Past and Future Academic Press pg. 105-129

- 124.- Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara,
Mori, T., Nishizuka, Y. (1979) J. Biol. Chem. 254,
3692- 3695
- 125.- Kishimoto A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U.,
Nishizuka, Y. (1980) J. Biol. Chem. 255, 2273-2276
- 126.- Bell, R.C., Kennerly, D.A., Standford, N., Majerus,
P.W. (1979) P.N.A.S. 76, 3238-3241
- 127.- Chau. L.Y., Tai, H.H. (1981) B.B.R.C. 100, 1688-
1695
- 128.- Okazaki, T., Sagawa, N., Bleasdale, J.E., Okita,
J.R., McDonald, P.C., Jhonston, J.M. (1981) J. Biol.
Chem. 256, 7316-7321
- 129.- Billah, M., Lapetine, E., Cuatrecasas, P. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 10227-10231
- 130.- Nahas, N., Graff, G. (1982) Biochem. Biophys. Res.
Commun. 109,1035-1040
- 131.- Hoffmann, S.L., Majerus, P.W. (1982) J. Biol. Chem.
257, 14359-14364
- 132.- Hirasawa, K., Irvine, R.F., Dawson, R.M. (1982)
Biochem. J. 206, 675-678
- 133.- Takai, Y., Kaibuchi, H., Matsubara, T., Nishizuka, K.
(1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 101,61-67

- 134.- Walenga, R., Opas, E., Feinstein, M. (1981) J. Biol. Chem. 256, 12523-12528
- 135.- Bills, T.K., Smith, J.B., Silver, M.J. (1979) J. Clin. Invest. 63, 580-587
- 136.- Lapetina, E.G., Billah, M.M., Cuatrecasas, P. (1981) Nature 292, 367-369
- 137.- Billah, M.M., Lapetina, E.G. (1982) J. Biol. Chem. 257, 5196-5200
- 138.- Walsh, C., Waite, B.N., Thomas, M.J., De Chatelet, L.R. (1981) J. Biol. Chem. 256, 7228-7234
- 139.- Waite, M., De Chatelet, L.R., King, L., Shirley, P.S. (1979) B.B.R.C. 90, 984-992
- 140.- Zurier, R.B., Sayadoff, D.M. (1975) Inflammation 1, 93-101
- 141.- Goldstein, I.M., Malmstem, C.L., Kimdahl, H., Kaplan, H.B., Radmask, O., Samuelsson, B., Weissman, G., (1978) J. Exp. Med. 148, 787-792
- 142.- Borgeat, P., Samuelsson, B. (1979) J. Biol. Chem. 254, 2643-2646
- 143.- Borgeat, P., Samuelsson, B. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2148-2152
- 144.- Stenson, W.F., Parker, C.W. (1980) J. Immunol 124, 2100
2104

- 145.- Naccache, P.H., Molski, T.F.P., Becker, E.L., Bargeat, P., Picard, S., Vallerand, P., Sha'afi, R.I. (1982) J. Biol. Chem. 257, 15, 8608-8611
- 146.- Palmer, R.J., Stepney, R., Higgs, G.A., Eakins, K.E., (1980) Prostaglandins 20, 411-
- 147.- Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.U., Shipley, M.E., Smith, M.J.H. (1980) Nature 286, 264-265
- 148.- O'Flaherty, J.T., Showell, H.J., Ward, P.A., Becker, E.L., (1979) Am. J. Pathol. 96, 799-809
- 149.- Naccache, P.H., Showell, H.J., Becker, C.L., Sha'afi, R.I., (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 87, 292-
- 150.- O'Flaherty, J.T., Wykle, R.L., Lees, C.J., Shewmak, T. McCall, C.E., Thomas, M.J. (1981) Am. J. Pathol. 105, 264-269
- 151.- Volpi, H., Naccache, P.H., Sha'afi, R.I., (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 1237-1241
- 152.- Bokoch, G.M., Reed, P.W. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 481-487
- 153.- Stenson, W.F., Parker, C.W. (1979) J. Clin. Invest. 64, 1457-1465
- 153 bis.- Stenson, W.R., Parker, C.W. (1979) Prostaglandins 18, 285-

- 154.- Benveniste, H., Henson PM., y Cochrane CG.
(1972) J. Exp. Med. 136, 1356-1377.
- 155.- Demopoulos C., Pinckard R y Hanahan D. (1979)
J. Biol. Chem 254, 9355-9358.
- 156.- McManus LM, Hanahan DJ, Demopoulos CA y Pinckard RN (1980) J. Immunol. 124, 2919-2924.
- 157.- Clark PO, Hanahan DJ y Pinckard RN (1980)
Biochem Biophys. Acta 628, 69-75.
- 158.- Camussi G., Aglietta M, Coda R, Bussolino F
Piacibello W y Tetta C. (1981) Immunology 42
191
- 159.- Serhan C, Anderson P, Goodman E, y Dunham' B
y Weissmann G. J. Biol Chem (1981) 256, 2736-
- 160.- Vægaftig, BB, Lefort J, Chignard M, y Benveniste J. (1980) Eur. J. of Pharmacol. 65, 185
192.
- 161.- Shaw JO, Klusik SJ, y Hanahan DJ (1981) Biochim. Biophys. Acta 663, 222-229.
- 162.- Bussolino F y Camussi G (1980) Prostaglandins
20, 781
- 163.- Chitton FH, O'Flaherty JT, Walsh CE, Thomas
MJ, Wykle R, De Chatelet LK y Waite BM (1982)
J. Biol. Chem. 257, 5402-5407.

- 164.- Arnoux,G, Duval D y Benveniste J (1980)
Eur. J. Clin, Invest. 10, 437-
- 165.- Lynch JM, Lotner GZ, Betz SJ, y Henson PM
(1979) J. Immunol 123, 1219-1221
- 166.- Sánchez Crespo, M, Alonso F, y Egido J
(1980) Immunology 40, 645-
- 167.- Lotner GZ, Lynch JM, Netz SF y Henson PM
(1980) J. Immunol. 124, 676-
- 168.- Brittinger G, Hirschhorn R, Douglas Sd y
Weissman G (1968) J. Cell Biol. 37, 394-
401.
- 169.-Schrey MP y Rubin RP (1979) J. Biol. Chem
254, 11234-11241
- 170.- Renofij W y Snyder F (1981) Biochim. Bio-
phys Acta 663, 535-556.
- 171.- Pelech S. y Pritchard H, y Vance D. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 8283-8286.
- 172.- Work TS y Work KE Ed. (1972) Laboratory
Techniques in biochemistry and Molecular Bio-
logy. North Holland. pg 569
- 173.- Skurdal DN y Cornatzer WE (1975) Int. J. Bio-
chem (1975) 6, 579-583.
- 174.- Hoffman DR Uthus EO, Cornatzer WE (1980)
Lipids 15 439-446.

- 175.- Chiang PJ, Cantoni GL (1979) Biochem. Pharmacol. 28, 1879-1902.
- 176.- Pritchard PH, Chiang PK, Cantoni G y Vance DE (1982) J. Biol. Chem. 257, 6362-6367.
- 177.- Maziere C, Maziere JC, Huora ML y Polonovsky J. (1982) FEBS Lett. 139, 217-220.
- 178.- Alemany S., Varela I., y Mato JM. (1982) Biochem J. 208, 453-457.
- 179.- Battanchaya R. y Vonderhaan B. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4489-4492.
- 180.- Chiang PK, Cantoni GL, Boder JP, Shannan WM, Thomas HL y Montgomery IA (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 417-422.
- 181.- Morita Y, Siraganian RP, Tang CK y Chiang PK. (1982) Biochem. Pharmacol. 31, 2111-2113.
- 182.- De Blas A., Adler M. Chiang P., Cantoni G., y Nirenberg M. (1981) Transactions of the Am. Soc. Neurochem. 12, 110.
- 183.- Chiang PK, Richards HH, Cantoni GL (1977) Molec. Pharmacol. 13, 939-947.
- 184.- Cantoni GL y Chiang PK (1980) En "Natural Sulfur Compounds". Cavallini D., Gaull GE, y Zappia V. Eds. Plenum Press. New York (1980).
- 185.- Zimmerman TP., Wolberg G., Stopford G., y Duncan GS. (1979) En "Transmethylation" Usdin K., Borchardt V., y Crevelling Y. Eds Elsevier North Holland, inc. pg 187-196.

- 186.- Bareis DL, Hirata F., Shiffmann EC, Axelrod J.
(1982) J. Cell Biol. 93, 690-697.
- 187.- García Castro I., Mato, JM Vasanthakumar G, Weiss
mann WP., Shiffman E., y Chiang PK (1983) J. Biol.
(en prensa)
- 188.- Zimmermann, TP., Schmitges CS, Wolberg G., Deprose
RD., Duncan GS Cuatrecasas P y Elian GB. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci USA 77, 5639-5693.
- 189.- Randdon J., Lecompte T., Chignard M, Siess W.,
Marlos G., Dray F. y Vargaftig (1981) Nature 293
660-662.
- 190.- Hotchkiss A., Jordan JV, Hirata F., y Shulman R
y Axelrod J. (1981) Biochem. Pharmacol 30, 2089-
2095.
- 191.- Shattil S., Montgemery JA., Chiang PK. (1982) Blood
59, 906-912.
- 192.- Haslam (1978) Biochem J. 176, 83-95.
- 193.- Hirata F y Axelrod J. (1980) Nature 275, 219-220
- 194.- DE. Vance y Kruijft. (1980) Nature 288, 277-278.
- 195.- Colard O., y Breton M (1981) Biochem Biophys. Res.
Commun, 101, 727-733.
- 196.- Schhnce JS, Ogreid D., Doskeland SO., Refsnes N,
Sand TD, Usland PM y Christoffersen T. (1982)
FEBS Lett. 138, 167-172.
- 197.- Chauhan VPS, Kikka SC., Kalra VK (1982) Biochim.
Biophys. Acta 688, 357-368.

- 198.- Strittmatter WJ, Hirata F y Axelrod (1979)
Science 204, 1205-1207
- 199.- Kannagi R., Koizumi K., Hata-Tanque S y Masuda
T. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 711-
718.
- 200a.- Rehbinder D y Greenberg DM (1965) Arch. Biochem.
Biophys. 108, 110-115.
- 200b.- Tanaka Y., Doi O y Akamatsu Y. (1979) Biochem.
Biophys. Res. Commun. 87, 1109-1115.
- 201.- Kaneshiro T., Law JH. (1964) J. Biol. Chem. 239,
1705.
- 202.- Sastry BVR, Stathan CN, Axelrod J. y Hirata F.
(1981) Arch. Biochem. Biophys. 211, 762-773.
- 203.- Crews FT, Hirata F. y Axelrod J. (1980) J. Neuro-
chem 34, 1491-1498.
- 204.- Hoffman SL., Stephen MI y Majerus PW (1982) Bio-
chim. Biophys. Acta 215, 237-244.
- 205.- Lapetina EG, Billah MM, y Cuatrecasas P. (1981)
J. Biol. Chem 256, 5037-5040.
- 206.- Mauco G., Chap H., Blazy L. (1979) FEBS Lett.
100, 367-370.
- 207.- Bell R y Majerus P (1979) J. Biol. Chem. 255,
1790-1792.
- 208.- Lyons RM, Standford N. y Majerus PW (1975) J.
Clin. Invest. 56, 924-936 (1975).

- 209.- Takai, Y., Kaibuchi K., Matsubara T. y Nishizuka Y. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1981) 101, 61-67.
- 210.- Nishizuka Y. (1983) Trends in Biol. Sci. 8, 13-16.
- 211.- Billah M. y Lapetina E (1982) J. Biol. Chem 257, 5196-5200.
- 212.- Lapetina EG (1982) J. Biol. Chem 257, 7314-7317.
- 213.- Imai A y Nozawa Y. (1982) Biochem. Biophys. Res Commun. 105, 236-243.
- 214.- Lapetina E., Billah, M. y Cuatrecasas (1981) J. Biol. Chem 256, 5037- 5040.
- 215.- Billah y Lapetina EG. (1982) J. Biol. Chem 257, 11856-11859.
- 216.- Hong SL y Deykin D. (1981) J. Biol. Chem. 256, 5215-5219.
- 217.- Di Renzo GC, Johnston JM, Okazaki T, Okita JR, Mc Donald PC y Bleasdale JE (1981) J. Clin, Invest. 67, 847-856.
- 218.- Okazaki, T., Sagawa N. Okita JR y Bleasdale JE, MacDonald PC y Johnston JM. (1981) J. Biol. Chem. 256, 7316-7321.
- 219.- Sagawa N. Okazaki T., MacDonald PC., y Johnston JM (1982) J. Biol. Chem. 257, 8158-8162.

- 220.- Pastan IH, Willingham MC., (1981) Ann, Rev. Physiol. 43, 239-250.
- 221.- Pearse BMK y Bretscher MS. (1981) Ann. Rev. Biochem. 50, 85-101'
- 222.- Aggeler J. y Werb Z. 91982) J. Cell Biol. 94 613-623.
- 223.- Davies PJ., Davies DR., Levitzki, A., Maxfield FR., Milhand P, Willingham MC., y Pastan IH (1980) Nature 283, 162-167.
- 224.- Levitzki A, Willingham M, Pastan I (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2706-2710.
- 225.- Maxfield FR., Willingham MC., Davies PJA. y Pastan IH. (1979) Nature 277, 661-663.
- 226.- Haigler HT, Willingham MC y Pastan IH (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 94, 630-637.
- 227.- Haigler HY., Maxfield FR., Willingham MC y Pastan I (1980) J. Biol. Chem. 255, 1239-1241
- 228.- Schlegel R, Dickson RB, Willingham MC y Pastan IH (1982) Proc. Natl. Acad. Sci USA 79, 2291-2295.
- 229.- Hoffman CE. (1980) Antibiotics Chemother. vol. 27, 233-250.
- 230.- Pearlman Ds., Ward. PA, BeckerEL. (1969) J. Exp. Med. 130, 745-764.
- 231.- Musson, RA. y Becker EL (1977) J. Immunol. 118, 1354-1365.
- 232.- Walenga R., Vanderhoek JY y Feinstein MB. (1980) J. Biol. Chem 255, 6024-6027.

- 233.- Mato, JM., Pencev D., Vasanthakumar, G., Schiffman E., y Pastan IH (1983) J. Biol. Chem in press.
- 234.- Nahas N. y Graff G (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 109, 1035-1040.

